UNIVERSITE DE STRASBOURG - FACULTE DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 822

Les anticorps précipitants dans les staphylococcies expérimentales

Leurs rapports avec la pantothénothérapie

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 26 juin 1962
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
(Mention : Pharmacie)

par

Françoise GUILLAUME
Pharmacien
Diplômé de Sérologie

Examinateurs de la Thèse :

MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Ancien Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE FABRÈGUE
SAINT-YRIEIX
1962

UNIVERSITE DE STRASBOURG - FACULTE DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 822

Les anticorps précipitants dans les staphylococcies expérimentales

Leurs rapports avec la pantothénothérapie

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 26 juin 1962
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
(Mention : Pharmacie)

par

Françoise GUILLAUME

Pharmacien
Diplômé de Sérologie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Examinateurs de la Thèse :

MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Ancien Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE FABRÈGUE
SAINT-YRIEIX

1962

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. GAZET DU CHATELIER, *Doyen*
SCHREIBER, *Assesseur*
CLADY, *Secrétaire*

PROFESSEURS :

MM.	C. LAPP	Physique
	SARTORY	Bactériologie
	CORDIER	Pharmacie chimique
	DUQUENOIS	Matière médicale
	JAEGER	Botanique
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacie galénique
	HASSELMANN	Chimie analytique
	SCHREIBER	Chimie organique
	EBEL	Chimie biologique

MAITRES DE CONFERENCES :

MM.	LEDOUX	Sciences naturelles
	MÉTAIS	Sciences appliquées
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE :

M. COLLARD

COURS COMPLEMENTAIRES :

MM.	C. LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Eléments de Chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie anal. et séméiologique
	LAVIGNE	Législation et Déontologie
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techniq.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Eléments de mathématiques
	MEYER	Comptabilité et Fiscalité

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mme	KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
MM.	MATHIS	Chimie
	CARBIENER	Histoire naturelle
	STAHL	Bactériologie et Parasitologie
	C.F. LAPP	Chimie et Physique
	ROMOND	Bactériologie

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY
Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Ch. LAPP
Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER
Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A la Mémoire de

Monsieur le Professeur Y. VOLMAR

Doyen Honoraire de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

en témoignage de respect et de gratitude pour l'intérêt qu'il nous a toujours porté.

A Monsieur le Docteur R. RICHOU,

qui nous a si aimablement fourni les toxines et immunsérums sans lesquels l'élaboration de ce travail aurait été impossible. Qu'il soit assuré ici de notre profonde gratitude.

A mes anciens Professeurs de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

A la mémoire de mon Père,

dont la vie d'homme et de scientifique m'a toujours servie de guide.

A ma Mère,

à qui je dois plus que je ne saurais dire, en faible témoignage de mon affection filiale.

A mes Frère et Sœur,

A mes Neveux,

A mes Cousins,

avec toute mon affection.

A mes Amis.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548001_0013

INTRODUCTION

Face à la part importante que prend *l'acide pantothénique* dans le métabolisme protidique et dans la genèse des anticorps, il nous a semblé permis d'associer cette vitamine au *processus d'immunisation.*

En effet, PONNELLE (1) a déjà pu démontrer dans le *Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg,* que « *l'acide pantothénique semble prolonger ou protéger la vie des cellules et maintenir une sorte d'immunité locale, voire d'immunité générale de l'organisme* ». On pourrait donc le considérer comme un « *filtre physiologique* » qui retient les toxines de la nécrose cellulaire et les produits d'agressivité médicamenteuse.

L'acide pantothénique joue en quelque sorte le rôle d'un catalyseur dans la réaction antigène-anticorps ; s'il semble intervenir dans l'agglutinogenèse initiale, son rôle apparaît fondamental dans le maintien du taux élevé d'anticorps. De l'ensemble de ces constatations on peut conclure que la pantothénothérapie a un rapport manifeste avec le taux des agglutinines.

MEYER, MALGRAS et leurs collaborateurs ont testé expérimentalement l'immunité créée avec *l'anatoxine et le vaccin antistaphylococcique.* Deux groupes témoins n'ont pas reçu d'injections simultanées d'acide pantothénique en cours d'expérience. Les auteurs ne signalent pas de différence notable *de l'anatoxine par rapport au vaccin.* Par contre, l'association avec l'acide pantothénique se manifestait nettement le 60e jour pour le *vaccin* et le 45e jour pour l'*anatoxine,* par une augmentation des β- et γ- globulines et une stabilisation des agglutinines spécifiques et du complément.

PONNELLE tire des conclusions analogues de son expérimentation concernant l'*influence de l'acide pantothénique sur l'évolution immunologique au cours de la vaccination* T.A.B. Les sérums des sujets qui ont reçu cette vitamine en injection intramusculaire présentaient un taux de dilution du 1/200e et l'agglutination se manifestait encore quarante jours après la dernière injection, tandis que la dilution la plus élevée est du 1/80e pour le sujet témoin.

L'action anti-infectieuse de l'acide pantothénique s'est également manifestée à l'occasion d'une *épidémie rurale de diphtérie,* traitement employé par ACACIO DE ABREU (2). L'auteur a associé le pantothénate de dihydrostreptomycine (1,5 g) avec le Bépanthène (500 à 1.000 mg par jour) et les a injectés séparément par voie intramusculaire ou intraveineuse. A ce sujet,

il faut mentionner les travaux de MUCKTER, KELLER, KRUPE et SOUS (3), puis de COURVOISIER et LEAU (4) qui ont pu démontrer l'influence favorable de l'acide pantothénique sur la toxicité chronique de la *Streptomycine* résultant d'une action protectrice sur les éléments de l'ectoderme.

A la suite de ces travaux, RICHOU (5) a repris ses expériences pour étudier *l'influence de l'acide pantothénique sur la production de l'antitoxine staphylococcique* chez des lapins dépourvus d'immunité antistaphylococcique naturelle. Il émet les conclusions suivantes :

« *Il apparaît que les injections de pantothénate n'ont nullement favorisé le développement de l'antitoxine staphylococcique. D'autre part, le taux de l'immunité ne s'est pas maintenu plus élevé chez les lapins ayant reçu du pantothénate que chez ceux immunisés avec l'anatoxine staphylococcique seule. A la suite de l'injection de rappel, les lapins immunisés primitivement avec l'anatoxine seule ont montré une réactivité aussi marquée que ceux ayant bénéficié en même temps de l'action d'un pantothénate. Les injections de pantothénate se montrent donc incapables dans les conditions de nos essais, d'agir sur le développement et la stabilisation des antitoxines.* »

A la suite de cette controverse, nous avons repris ces recherches en employant *des antigènes et des toxines staphylococciques* pour la vaccination de nos animaux et nous avons recherché leur influence sur *la production d'anticorps*, en nous adressant principalement *aux précipitines*. A ce sujet, nous avons eu recours à la méthode de DEAN et WEBB, l'immuno-électrophorèse, et surtout *la biophotométrie* de BONET-MAURY qui devait nous permettre d'enregistrer mécaniquement *le taux de précipitines* apparaissant chez les animaux ayant reçu le vaccin seul ou associé au Bépanthène.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous ne voudrions pas manquer d'exprimer notre sincère gratitude à Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* ; il nous a aimablement accueilli dans son laboratoire et nous fait aujourd'hui le grand honneur de présider notre Jury de thèse.

Nos remerciements vont également à Monsieur Ch. LAPP, *Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* pour la gentillesse avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Nous ne voudrions pas manquer de témoigner ici notre reconnaissance à Monsieur J. MEYER, *Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* ; après nous avoir suggéré le sujet de notre travail, il nous a toujours guidé et conseillé avec sa gentillesse coutumière, nous en facilitant l'élaboration dans la mesure du possible.

Nous gardons un excellent souvenir de tous ceux qui nous ont entouré pendant notre travail dans les laboratoires de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

PLAN DE TRAVAIL

La première partie de notre travail donne un aperçu général sur les *toxines staphylococciques* et leur genèse. Nous y envisageons les techniques de préparation de ces toxines, les milieux les plus favorables ainsi que les conditions culturales au point de vue température et importance de l'atmosphère de gaz carbonique. Puis nous étudions les relations entre le pouvoir toxigène, le pouvoir hémolytique, cytolytique et dermonécrotique. Nous donnons succinctement les propriétés de ces antigènes.

Nos travaux personnels sont décrits dans quatre chapitres, dont le premier relate le choix d'une méthode apte à la mise en évidence de la *réaction antigène-anticorps*. Nous avons ainsi l'occasion de décrire brièvement les principes de la réaction *d'immuno-électrophorèse, d'agglutination* et de *floculation*.

Dans le chapitre IV, nous envisageons la *méthode de précipitation de* DEAN et WEBB et le *chapitre V* a trait à nos méthodes d'adaptation de cette réaction à la *biophotométrie*.

Le chapitre VI est réservé à la préparation et à l'expérimentation des toxines et des immunsérums utilisés dans nos essais. Nous vaccinons nos animaux à l'aide d'une *polytoxine* et *d'anatoxine de l'Institut Pasteur*, et nous étudions le pouvoir immunisant de ces antigènes employés seuls ou en association avec la pantothénothérapie quotidienne, par le contrôle du taux des précipitines.

Des *conclusions générales* terminent notre exposé.

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

LES TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

D'après les travaux de RICHOU, deux facteurs sont nécessaires et essentiels pour la production des toxines staphylococciques : *milieu de culture adapté* et *souche toxigène.*

Ce problème est très complexe, puisqu'un milieu peut convenir à une souche et non à une autre. D'autre part, la même souche ensemencée dans les mêmes conditions et sur le même milieu, peut donner des toxines de valeur tout à fait différente. RICHOU voit dans ce fait l'explication des divergences d'opinion d'un grand nombre d'auteurs sur *la toxigenèse staphylococcique.*

Il n'est donc pas étonnant que l'on trouve de très nombreux milieux de culture liquides ou solides, simples ou complexes proposés pour l'étude de la production des toxines staphylococciques.

Les premiers substrats ont été proposés en 1914 par DUMAS (6) NICOLLE et CESARI (7). Entre 1920 et 1930 ces recherches ont été poursuivies par WALBUM (8), PARKER (9), GROSS (10), BURNET (11) et NELIS (12). Tous ces auteurs ont eu recours à des milieux à base de peptone. BURNET a montré l'importance du pH et il lui revient le mérite d'avoir introduit *la notion de culture de Staphylocoques dans une atmosphère contenant* 10 % *d'anhydride carbonique.* Certains de ces milieux sont encore couramment employés, sous forme liquide ou solide.

MILIEUX LIQUIDES :

Les plus importants sont : le bouillon à base d'hydrolysat pepsique de viande de veau ; le bouillon à base de peptone pepsique de veau sans glucose ni acétate ; le milieu à base de rate de veau et de peptone pepsique de viande de bœuf ; le milieu à base de viande de cheval digérée par la papaïne ; le milieu semi-synthétique de KIRKBRIDE, BERTHELSEN et CLARCK utilisé par LÉONARD et HOLM (13), puis le milieu synthétique de RAMON, BOIVIN et RICHOU.

Bouillon à base d'hydrolysat pepsique de viande de veau :

Il a été réalisé par NELIS (14) en 1936 et constitue une modification du substrat mis au point par RAMON pour l'obtention des *toxines diphtériques* de haute valeur antigénique. Ce milieu consiste en une digestion de panse de porc et de viande de veau dans de l'eau additionnée d'acide chlorhydrique et amenée à un pH de 7,0. On stérilise, puis on ajoute le glucose. NELIS ensemence avec une souche toxigène en atmosphère de 20 % de CO^2 et obtient des toxines staphylocôcciques à pouvoir hémolytique plus prononcé qu'avec tous les autres milieux. L'auteur a ensuite essayé d'augmenter le plus possible la quantité de panse de porc et de diminuer d'autant la viande de veau, plus coûteuse.

SCHWARTZ (15) a essayé d'améliorer encore ce milieu en y introduisant une décoction de viande de veau préparée à part. Il emploie de la peptone liquide provenant de panse de porc et ajoute ensuite la décoction de viande de veau. Des quantités égales des deux substrats ont donné les meilleurs résultats. Une amélioration a encore été enregistrée par passage à la glacière pendant 24 heures et tyndallisation à 100° au lieu de la stérilisation à l'autoclave à 110°.

Bouillon à base de peptone pepsique de viande de veau sans glucose ni acétate :

RAMON (16) a utilisé ce milieu en 1936, en se basant sur ses résultats de 1933 pour la production de *la toxine diphtérique*. Il est du même type que le milieu de NELIS sans addition de glucose et à pH = 7,5. La culture est également effectuée en atmosphère de 20 % de CO^2. Pour transformer la toxine staphylococcique en anatoxine, il convient d'ajouter une quantité assez forte de formol. CASMAN (17) a amélioré ce milieu en y ajoutant 2 % de *protéose peptone Difco.*

Milieu à base de rate de veau et de peptone pepsique de viande :

RAMON a mis au point, avec BERTHELOT et AMOUREUX (18) un milieu à base de rate de veau riche en nucléoprotéides et acides aminés, dont l'action favorable a été démontrée par GENGOU. Ce bouillon, facile à préparer et économique, a été utilisé par RAMON pour la production de *la toxine tétanique ;* il a l'inconvénient de rendre difficile la transformation de toxines en anatoxines.

Milieu semi-synthétique :

Ce substrat contient 20 % de *peptone protéose Difco* et divers sels. Les toxines ainsi obtenues sont très virulentes.

Milieu synthétique :

Knight (19) a montré que l'on pouvait cultiver le Staphylocoque *sur un milieu de constitution chimique nettement définie.* L'azote est fourni par un mélange d'acides aminés et l'auteur y a introduit des traces de deux facteurs de croissance indispensables, *l'acide nicotinique et l'aneurine.* Ramon. Boivin et Richou (20) affirment que les Staphylocoques poussent abondamment sur ce milieu et qu'ils produisent leurs endotoxines spécifiques. Pour réaliser ce milieu, on part du mélange d'acides aminés obtenu par l'hydrolyse acide de la gélatine. Cette réaction s'effectue au moyen d'acide sulfurique et sous pression. Ce substrat a l'avantage de permettre sans difficulté la transformation de la toxine en anatoxine.

Milieu à base de digestion papaïnique de viande de cheval :

Ce substrat, préparé par Ramon et ses collaborateurs (21) pendant la dernière guerre a été repris et utilisé par Richou sous le nom *de milieu* R.A.P. *Il semble le meilleur pour la formation des toxines* et nous y avons eu recours comme nous le verrons plus loin.

MILIEUX SOLIDES :

Walbum (22), Oppenheimer (23), Bigger et ses collaborateurs (24), ainsi que Gross, Burnet ont tous utilisé des milieux à base de gélose ; la culture adulte est émulsionnée dans du soluté physiologique, décantée et sert à l'isolement des toxines.

Gélose demi-molle :

Ce bouillon gélosé à 0,8 % et à pH = 7,6 a été employé par Burnet et Schwartz, mais avec un rendement moins favorable. Divers auteurs anglais et américains ont essayé de l'améliorer par addition de *bouillon Martin* et de 0,5 % de *glucose.* La culture était faite en atmosphère de CO^2 ; ils ont ainsi pu obtenir une toxine à pouvoir plus élevé que celle obtenue sur le bouillon seul.

Culture en sac de cellophane :

En se référant à des méthodes employées pour la production de la *toxine dysentérique*, Schwartz, ainsi que Seiffert (25) ont appliqué ce

procédé à la production de la toxine staphylococcique et ont pu améliorer la valeur de la toxine obtenue. Douglas et Mac Clean (26) ont pu confirmer ces résultats et émettent l'opinion que tout comme la gélose, mais à un degré plus élevé, *la cellophane possède la propriété d'adsorber une substance du milieu qui serait inhibitrice de la toxine.*

CULTURE ITERATIVE :

Ce nom a été donné par Schwartz à des cultures répétées plusieurs fois dans un même bouillon. En cultivant *des Staphylocoques toxigènes* dans des filtrats de culture déjà toxiques, on a pu augmenter encore cette toxicité. Cependant, *les toxines ainsi obtenues sont accompagnées de substances microbiennes qui sont nuisibles pour la thérapeutique humaine.*

En conclusion, on peut dire avec Ramon qu'il est préférable d'employer des milieux habituellement utilisés pour la préparation des *toxines diphtériques et tétaniques.* Leur préparation est simple et économique et l'on obtient ainsi *des toxines et anatoxines* dont la valeur antigénique est optimale.

INFLUENCE DU GAZ CARBONIQUE ET DE DIVERSES SUBSTANCES INTRODUITES DANS LE MILIEU DE CULTURE :

La culture en atmosphère de CO^2 préconisée par Parker en 1925 et reprise par Burnet en 1930, constitue une condition essentielle pour l'obtention d'une bonne toxine staphylococcique. Tous les auteurs sont d'accord sur ce point et la proportion optimale semble être de 20 % de CO^2.

Lors de la préparation de la toxine, nous avons utilisé un dispositif de production de CO^2 que nous décrirons ultérieurement ; le meilleur rendement semble être obtenu par l'emploi d'un circuit d'un mélange CO^2 + air.

Divers essais ont été effectués pour supprimer l'emploi du CO^2, notamment par Schwartz, ou pour produire du CO^2 à l'intérieur du substrat nutritif par addition de glucose. Cependant les résultats ont été médiocres.

On connaît mal le mode d'action du CO^2 dans la production de *la toxine staphylococcique.* Vraisemblablement agit-il sur le pH intracellulaire ou sur celui du milieu. En ce qui concerne le pH du milieu, les avis des auteurs divergent. Schwartz, qui a longuement étudié la question, pense qu'un pH acide serait préférable au départ ; il a adopté pour l'amorcement de la culture un pH de 6,8 et au cours de la culture le milieu doit rester entre pH 6,8 et 7,4. A titre documentaire. nous donnons les pH adoptés par quelques auteurs :

Burnet : pH = 6,0 ; Nelis : pH = 7,0 ; Parker, Ramon : pH = 7,4 ; et d'après Richou, le pH optimal semble être 7,4.

Quelques chercheurs ont tenté d'améliorer le rendement de la toxigenèse par l'emploi de *solution tampon,* mais selon Richou les résultats sont inégaux et *le milieu* R.A.P. n'en contient pas.

D'autres auteurs ont préconisé l'emploi *d'hydrates de carbones* et le *glucose*, en particulier, a été ajouté aux milieux dans le but d'empêcher l'alcalinisation secondaire des cultures grâce à la réaction acide provenant de la dégradation de cet ose par les *Staphylocoques*. RAMON l'a cependant abandonné et il est d'avis que l'utilisation de glucides ne semble pas nécessaire.

Quant aux *peptones* et aux *acides aminés*, de nombreux auteurs ont eu recours à la peptone de WHITE. SCHWARTZ conclut de ses essais que *les Staphylocoques* peuvent sécréter leurs toxines en l'absence de peptone et qu'il est inutile et même défavorable de prolonger la digestion pepsique.

Entre temps, RAMON, BOIVIN et RICHOU, ainsi que GLADSTONE *ont pu montrer que la peptone n'est pas nécessaire à la production de toxines.*

Diverses autres substances, telles que *l'hémoglobine*, *le sérum*, *le liquide d'ascite* ont été utilisés avec des succès divers. Il faut remarquer que *l'aneurine* et *l'acide nicotinique* sont d'indispensables facteurs de croissance pour la production de toxines à partir de milieux synthétiques. La toxigenèse peut être favorablement influencée par une agitation régulière et continue du milieu de culture.

Après avoir passé en revue les principaux milieux de culture employés pour l'obtention de *toxines staphylococciques*, nous allons dans le chapitre suivant donner les généralités concernant cette toxigenèse.

CHAPITRE II

LA TOXIGENESE STAPHYLOCOCCIQUE

Pour l'obtention d'une bonne toxine staphylococcique il faut non seulement un milieu de culture favorable, mais encore une souche hautement toxigène. KOURILSKY, MERCIER et PILLET (27) ont trouvé un grand nombre de souches de *Staphylocoques* élaborant de l'*hémolysine*. Il semble que de très nombreuses souches de *Staphylocoques* se montrent capables de produire de la toxine, mais très peu ont la propriété de produire celle-ci en grande quantité.

RELATION ENTRE LA GRAVITE DES AFFECTIONS STAPHYLOCOCCIQUES ET LE POUVOIR TOXIGENE :

Il semble établi, à la suite de travaux de différents auteurs, dont SCHWARTZ, *qu'un Staphylocoque isolé d'une infection aiguë peut être peu toxigène, alors qu'un Staphylocoque provenant d'un sujet bien portant peut être très toxigène.* Il est d'autre part prouvé que la provenance des souches est sans importance pour leur valeur toxigène, qu'elles soient d'origine humaine ou animale.

D'après RAMON, RICHOU et MERCIER (28) *virulence et toxicité* semblent être deux propriétés bien distinctes. NELIS et THIEFFERY ont montré que des passages sur le lapin augmentent la *virulence* du Staphylocoque, sans augmenter son *pouvoir toxigène. Mais celui-ci apporte son appui à la virulence*, car il facilite la pullulation du germe par son action sur les tissus.

RELATION ENTRE LE POUVOIR TOXIGENE ET LE POUVOIR HEMOLYTIQUE :

La culture en milieu liquide et en atmosphère de CO^2 constitue la méthode de choix pour déterminer le pouvoir toxigène exact d'*un Staphylocoque.* Tous les auteurs sont d'accord sur le point qu'il existe un rapport entre celui-ci et la formation d'un voile à la surface du milieu. Ainsi, NELIS a observé *que les souches toxigènes, sauf une exception, ont donné à la surface du bouillon une pellicule dès la 24e heure de culture.* Ce voile tombe ensuite au fond du récipient.

Quelques auteurs ont noté une relation entre la conservation des souches et le pouvoir toxigène. On a obtenu d'excellents résultats en pratiquant sur des lapins des passages successifs d'une souche de Staphylocoques et en desséchant en ampoules le sang des lapins infectés. Le même résultat peut être obtenu en soumettant des souches à la lyophilisation.

En ce qui concerne *le pouvoir hémolytique* SCHWARTZ dit avoir observé fréquemment des souches non hémolytiques dans des conditions de culture imparfaites et qui se révèlent toxigènes quand on pratique la culture dans des conditions favorables. Au contraire, cet auteur a étudié une souche qui hémolysait fortement la gélose au sang, alors qu'elle ne produisait qu'une toxine médiocre. Des faits identiques ont été signalés par BIGGER et ses collaborateurs, par SEIFFERT et par KOURILSKY et MERCIER.

Un autre processus influe sur *la toxigenèse*, que l'on peut réaliser par enrichissement du milieu de culture. Etant donné qu'une très longue incubation occasionne la multiplication des produits d'autolyse microbienne, RAMON et ses collaborateurs recommandent de filtrer les bouillons vers le 7e jour de culture.

En résumé, nous pouvons dire que la souche 72 de NELIS, la souche Wood de BURNET, cultivées pendant 7 jours à 37° en atmosphère à 20 % de CO^2 permettent d'obtenir sur des milieux favorables et en particulier sur le milieu à base *de viande de cheval digérée par la papaïne* des toxines vraiment bonnes, capables d'être utilisées pour des recherches expérimentales et pour la production de vaccin.

PROPRIETES DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE :

Comme toutes *les exotoxines, la toxine staphylococcique* possède deux sortes de propriétés : *toxiques et antigéniques.*

En ce qui concerne les *propriétés toxiques*, nous pouvons distinguer surtout :

— Le pouvoir cytologique pour les hématies,

— Le pouvoir dermonécrotique et

— Le pouvoir léthal.

Pouvoir cytologique ou hémolytique :

La découverte de la présence d'un poison dans les cultures de *Staphylocoques* remonte à 1891 et fut réalisée par ARLOING. Le premier, en 1894, VANDEVELDE a signalé *le pouvoir hémolytique* de la toxine staphylococcique.

Depuis, l'on a distingué des hémolysines α, β, γ, δ.

HEMOLYSINE α :

Elle semble la plus importante.

Recherche et mise en évidence : Il suffit de mettre des quantités variables et décroissantes de toxine en présence d'une goutte d'hématies de lapin, et de porter à l'étuve à 37°. On retient le tube où la plus petite quantité de toxine a hémolysé totalement après une heure d'étuve et une heure à la température du laboratoire, les globules de lapin étant lavés trois fois et dilués au 1/3. Cette quantité est la *dose minimale hémolytique.*

Nous reviendrons plus loin sur la préparation des hématies de lapin.

Le phénomène hémolytique est un phénomène de zone, qui demande des précautions dans le prélèvement, la centrifugation, la redissolution, le maintien de la température (37° étant la température optimale) pendant l'expérience.

Les hématies de lapin se prêtent parfaitement à cette étude, *l'hémolysine* α ayant une action élective sur les globules de lapin.

Ce phénomène est très important, car il joue un rôle « *in vivo* » chez les sujets atteints de staphylococcies.

HEMOLYSINE β :

Ce sont les *globules de mouton* qui sont le plus sensibles à cette hémolysine. Placés à l'étuve au contact de la toxine staphylococcique, ils subissent une hémolyse qui se poursuit à la glacière. C'est ce que Bigger, Boland et O'Meara appellent le « *hot-cold-lysis* ».

La différenciation de ces *deux hémolysines α et* β est intéressante par la production d'*anticorps spécifiques.*

Ces différentes hémolyses ont été étudiées sur gélose au sang et sur filtrat staphylococcique.

L'intérêt des *hémolysines* γ *et* δ semble très limité ; par contre, Richou a étudié depuis 15 ans les *hémolysines α et* β et conclut que *l'hémolysine* α joue un rôle prépondérant chez l'homme, tandis que *l'hémolysine* β ajoute. chez l'animal, son action nocive à celle de *l'hémolysine* α.

Du mécanisme de l'hémolyse, il ressort que :

— La toxine se fixe sur les hématies, qu'elle lyse ;

— La toxine se fixe sur les hématies en quantité plus grande qu'il n'est nécessaire pour les lyser ;

— La toxine peut se fixer sur les hématies de certains animaux sans les lyser.

Autres actions cytolytiques :

L'action lytique de la toxine peut atteindre, outre *les hématies et les leucocytes* (*leucocidine*), de multiples cellules de l'organisme : éosinophiles. cellules nerveuses des ganglions lymphatiques, cellules de la moëlle osseuse, du foie, du rein, de la rate, des capsules surrénales. Les cellules nerveuses apparaissent les plus sensibles à l'action lytique.

Importance du phénomène cytolytique :

La toxine staphylococcique apparaît donc capable de causer des lésions de tous les organes, d'où son rôle très important dans la pathogénie. Néanmoins, ce rôle n'a pas encore été exactement déterminé « *in vivo* » et le pouvoir hémolytique n'est qu'une des nombreuses propriétés de la toxine staphylococcique.

ACTION DERMONECROTIQUE :

Ce pouvoir fut mis en évidence en 1914 par NICOLLE et CESARI. La toxine staphylococcique semble avoir une affinité élective pour le derme. Les réactions histologiques dues à l'injection de la toxine ont été étudiées par PARKER. D'après DELAUNAY et LAFARGUES, il s'agirait d'une action directe du poison sur les cellules. La réaction peut être constatée chez le lapin comme chez le cobaye. *Mais* RICHOU *a constaté que le cobaye et le lapin blanc étaient plus sensibles que le lapin gris.*

Ces différences sont dues au fait que la *réaction dermonécrotique* est, chez certains animaux, plus ou moins empêchée par la présence dans leur sérum d'*antitoxines staphylococciques* d'origine naturelle.

On a constaté que la réaction est toujours plus marquée au niveau de l'abdomen qu'au niveau du thorax.

La répétition d'injections de toxine donne des réactions de plus en plus faibles, ceci étant dû à l'apparition d'antitoxines spécifiques.

Cependant, BURKY a observé des réactions de plus en plus fortes aux injections, qu'il attribue à une *sensibilisation allergique* de l'animal, ce que nous avons également pu constater au cours de nos travaux.

Il a été observé que la réaction pouvait être inhibée par injection préalable de chlorure de sodium.

Importance de ce phénomène :

Ce *phénomène dermonécrotique* joue un rôle très important en pathogénie des staphylococcies : lésions au niveau du genou, furoncles et anthrax par exemple. Lorsqu'il est lancé dans la circulation générale, *le Staphylocoque* se fixe sur les divers organes et produit des foyers de nécrose ; en particulier au niveau du rein, le rôle joué par l'action nécrotique de la toxine staphylococcique a été étudié en détail par RAMON, BOCAGE, RICHOU et MERCIER.

ACTION LETHALE :

Le lapin est l'animal qui convient le mieux à l'étude de ce pouvoir. Les effets toxiques sont très différents suivant la voie d'introduction.

L'injection intradermique provoque les phénomènes nécrotiques précédemment étudiés.

L'injection sous-cutanée donne des nécroses locales. A très haute dose, elle peut provoquer la mort.

L'injection intramusculaire ne provoque la mort qu'après plusieurs jours et après formation d'une très large zone de nécrose autour du point d'injection.

Une toxine préparée par RAMON et RICHOU tuait le lapin par *voie intramusculaire* à la dose de 0,5 cc en 36 à 48 heures.

MELIS a injecté une dose appropriée à la face interne de la cuisse et a obtenu une paralysie du membre inférieur.

L'injection intraveineuse est le procédé de choix pour étudier le pouvoir toxique de la toxine staphylococcique. Cette voie provoque des accidents rapides.

Les toxines α, β et γ sont également mortelles pour le lapin, la toxine γ étant cependant la moins nocive.

L'injection intra-artérielle provoque une paralysie flasque d'origine circulatoire du membre injecté.

Les effets physiologiques de la toxine staphylococcique ont été très étudiés, en particulier par BURNET.

Selon sa voie d'introduction, la toxine staphylococcique se montre *cardiotoxique* ou *neurotoxique*. D'après QUEVAUVILLER, elle agirait non seulement sur le système nerveux central, mais aussi sur la cellule nerveuse périphérique. Excitante à faibles doses, elle est paralysante à doses fortes.

Les différentes lésions provoquées par les divers modes d'introduction de cette toxine ont été également étudiées sur le lapin.

ACTION DES AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE :

La toxine staphylococcique apparaît plus sensible aux agents physiques et chimiques que les autres poisons microbiens.

La *filtration sur filtre de Seitz* diminue le pouvoir toxique, mais moins que la *filtration sur bougie* L_3 ; cette perte varie avec le bouillon de culture.

Les résultats obtenus par le chauffage sont assez discordants suivant les auteurs.

RAMON et RICHOU ont exposé la toxine staphylococcique à des températures variables durant 40 à 45 minutes et ont observé que les propriétés antigènes et toxiques commencent à s'altérer à 50° et sont presque complètement détruites à 60°. L'influence du pH joue sur la résistance de la toxine à la chaleur.

L'action de la chaleur sur l'hémolysine α est importante, car le chauffage est une méthode de séparation des toxines α et β, cette dernière étant plus résistante à la chaleur. En effet, le chauffage à 60° pendant 45 minutes détruit complètement *l'hémolysine* α, mais laisse à *l'hémolysine* β une partie importante de son pouvoir.

On constate une atténuation de la toxine par le vieillissement. Pour étudier l'influence du charbon et d'autres réactifs adsorbants, on mélange la toxine avec du charbon, etc., et on filtre sur bougie ; *on note une baisse du pouvoir hémolytique.*

A dose suffisante, *l'aldéhyde formique* joue un rôle détoxiquant très important.

ACTION DES ANTIBIOTIQUES :

Les *substances antibiotiques purifiées* n'ont aucune action sur la toxine staphylococcique ; par contre les « *complexes antagonistes* », selon l'expression de Ramon et Richou, qui sont des filtrats de culture de germes antagonistes (filtrat de culture de *Bacillus subtilis*, à parties égales avec toxine staphylococcique ; de même, filtrat de *Penicillium notatum*, *d'Actinomyces griseus*) détruisent les toxines d'origine microbienne et en particulier staphylococciques.

Parmi les actions exercées par les agents physiques et chimiques sur la toxine staphylococcique, l'action du *formol*, de la *chaleur* et des *complexes antagonistes* sont les plus intéressantes.

TITRAGE DES PROPRIETES TOXIQUES DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE :

Le pouvoir toxique de la toxine staphylococcique peut être mesuré en recherchant soit la *dose minimale hémolytique*, soit la *dose minimale nécrosante* pour le derme de lapin, soit encore *la dose léthale* par injection dans la veine du lapin.

RECHERCHE DE LA DOSE MINIMALE HEMOLYTIQUE DE LA TOXINE α :

La dose minimale hémolytique est la plus petite quantité de toxine capable d'hémolyser une goutte de globules rouges de lapin lavés trois fois et dilués au 1/3.

Nous décrirons la méthode dans nos travaux personnels.

RECHERCHE DE LA DOSE MINIMALE NECROSANTE DE LA TOXINE α :

La dose minimale nécrosante est la plus petite quantité de toxine qui, injectée dans le derme de lapin, est encore capable de faire apparaître une escarre.

Il convient de s'assurer que le lapin ne possède pas d'immunité naturelle en recherchant *l'antitoxine spécifique* dans son sérum.

RECHERCHE DE LA DOSE LETHALE MINIMALE DE LA TOXINE α :

C'est la plus petite dose de toxine, injectée par voie intraveineuse, capable d'entraîner la mort de l'animal d'expérience.

La toxine β peut être titrée de la même façon que la toxine α, en utilisant des *hématies de mouton* pour l'hémolyse, ou en étudiant l'érythème qu'elle cause lorsqu'on l'injecte dans le *derme du cobaye* ; on détermine la dose léthale sur *le lapin.*

PROPRIETES ANTIGENIQUES :

En dehors de ses propriétés toxiques, *la toxine staphylococcique* est douée d'un pouvoir antigène. Elle peut donner, chez l'homme comme chez l'animal, une antitoxine spécifique qui permet de créer *l'immunité anti-staphylococcique.*

Immunisation de l'homme et des animaux d'expérience :

La vaccination s'effectue de différentes façons :

— Par voie *cutanée ou sous-cutanée ;*

— Par voie *musculaire ;*

— Par voie *veineuse.*

La première est la meilleure : PARKER a constaté que des injections à trois ou quatre jours d'intervalle, à la dose de 1 cc de toxine, font apparaître l'immunité 14 jours après le début de la vaccination.

D'après RAMON et RICHOU, seule l'*anatoxine staphylococcique* permet une immunisation facile, rapide et sans danger.

Titrage de la valeur antigène de la toxine :

Le pouvoir antigène peut être évalué en recherchant soit la *dose-test hémolytique*, soit la *dose-test cutanée*, soit la valeur en *unités floculantes* de cette toxine.

RECHERCHE DE LA DOSE-TEST HEMOLYTIQUE DE LA TOXINE α :

La dose-test hémolytique ou « *dose combinée hémolytique* » est la plus petite quantité de toxine qui, ajoutée à 1 unité antitoxique, est capable d'hémolyser 1 goutte d'hématies de lapin lavées trois fois et diluées au 1/3.

On opère de la façon suivante : on introduit dans une série de tubes à hémolyse 1 cc d'une dilution de sérum étalon, *de sorte que 1 cc de cette dilution renferme 1 unité antitoxique internationale*, puis des quantités croissantes de la toxine à titrer.

On ramène chaque mélange au même volume au moyen de soluté physiologique et on ajoute dans chaque tube une goutte d'hématies de lapin. Après agitation, on porte à l'étuve pendant 1 heure. La lecture est faite une heure après la sortie de l'étuve et à la température du laboratoire.

FLOCULATION :

Par ses travaux, BURNET est arrivé aux constatations suivantes :

1° La toxine staphylococcique flocule spécifiquement.

2° La floculation optimale se trouve toujours en rapport avec le point de neutralisation du mélange toxine-antitoxine, contrôlé par la réaction hémolytique.

On observe la floculation initiale, c'est-à-dire le mélange dans lequel la toxine et l'antitoxine se sont mutuellement et exactement saturées.

Connaissant alors la valeur de l'un des deux éléments, on peut facilement en déduire la valeur de l'autre.

RELATION ENTRE LES DIVERSES PROPRIETES DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE :

La relation apparaît très étroite entre les valeurs obtenues par les deux méthodes de dosage « *in vitro* » du pouvoir antigénique : d'une part la recherche de la dose combinée hémolytique, d'autre part la floculation.

Conclusion :

Etant donné l'instabilité des propriétés de la toxine staphylococcique, la méthode de floculation apparaît donc comme la meilleure pour évaluer le pouvoir antigène de cette toxine. Il est bon néanmoins de lui associer la réaction hémolytique.

En résumé, *la toxine staphylococcique paraît capable de jouer un rôle très important dans les affections humaines dues à des Staphylocoques qui élaborent la toxine* α.

Ces études montrent la nécessité de préparer, pour le traitement des *staphylococcies humaines*, des *anatoxines* à partir de bouillons staphylococciques riches en *toxine* α et pour celui des *staphylococcies animales des anatoxines* renfermant à la fois *l'antigène* α et *l'antigène* β.

Ayant ainsi exposé les méthodes de préparation des toxines actives des Staphylocoques et celles du contrôle analytique de leur pouvoir immunisant et antigénique, nous allons maintenant décrire nos travaux personnels.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

CHOIX D'UNE METHODE APTE A LA MISE EN EVIDENCE DE LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS

Nous avons actuellement à notre disposition différentes méthodes de précipitation des mélanges antigène-anticorps.

La dernière venue est la réaction *d'immuno-électrophorèse* qui permet d'effectuer sur un même petit échantillon une séparation *électrophorétique* combinée à des réactions *immuno-chimiques*. Sous le terme d'électrophorèse on comprend le phénomène physique de la migration de diverses fractions protéiques à travers un substrat de support donné.

Chaque molécule protéique possède une sensibilité spécifique vis-à-vis d'une charge électrique qui détermine sa mobilité électrophorétique. Sous l'action d'une différence de potentiel électrique les molécules se déplacent dans un milieu tampon de pH convenable, à des vitesses variables mais constantes pour chaque fraction. Les protéines se répartissent ainsi en zones nettement distinctes sur le substrat de support choisi. Après l'électrophorèse on peut fixer et colorer les diverses zones protidiques, puis en mesurant l'intensité de coloration de ces zones, on peut établir un graphique appelé *électrophorégramme*.

L'immuno-électrophorèse est donc une *électrophorèse de zone*. Alors que l'électrophorèse se pratique d'habitude sur papier-filtre spécial, l'immuno-électrophorèse s'effectue plus avantageusement en couche gélosée. En effet, la gélose présente l'avantage d'une moindre rétention des protéines ; cependant, le phénomène *d'électro-endosmose* fait migrer l'eau et les ions dans le sens inverse du déplacement électrophorétique des protéines. Ceci est dû au groupement SO^3H de la gélose soumise à une différence de potentiel. On a pu mesurer cette réaction grâce au *dextrane qui ne se déplace que par électro-endosmose.*

PRINCIPES DE LA REACTION IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE :

De nombreux auteurs ont fait des recherches pour mettre au point une technique de séparation des constituants d'un corps complexe protéînique par la méthode électrophorétique et de mise en évidence des réactions antigène-anticorps par le phénomène de précipitation spécifique en utilisant des immunsérums appropriés. *L'immuno-électrophorèse permet de déceler dans un très petit volume de liquide organique les différents composants immunologiques et de les déterminer qualitativement et quantitativement.*

Le principe de cette technique consiste à effectuer une électrophorèse du mélange antigène-anticorps dans un gel de gélose formant le support de migration. On fait diffuser d'abord l'immunsérum perpendiculairement à l'axe de migration électrophorétique en déposant dans la gélose encore liquide deux baguettes de verre parallèlement à l'axe de la migration et à une distance convenable et constante d'un réservoir central. Chaque constituant donne une fine bande de précipité avec l'antigène correspondant, qui peut être définie par son emplacement sur l'axe de migration. *Le nombre de lignes de précipitation permet de mettre en évidence le nombre minimal de composants du mélange antigène-anticorps.*

Description de la méthode :

Elle comporte quatre étapes :

— La préparation des plaques de gélose dans lesquelles on introduit le produit à analyser.

— L'électrophorèse dans la gélose.

— La réaction de précipitation.

— L'enregistrement du résultat.

La gélose :

Nous avons utilisé du *Bacto Agar Difco* en paillettes ; c'est un produit très pur, mais qui doit néanmoins être lavé à plusieurs reprises. On fait une solution de gélose de 4 à 5 % ; on coule dans un récipient plat et on laisse solidifier. On découpe alors la plaque en petits cubes que l'on lave à l'eau distillée pendant trois jours en changeant l'eau matin et soir.

On ramène ensuite la gélose exactement à 2 % par rapport au poids des cubes de gélose séchés. On liquéfie la gélose et on ramène à la concentration de 2 % en diluant avec la *solution tampon de véronal sodique* à pH = 3,2 et force ionique 0,05. On filtre et on coule sur plaque de verre. Pour faciliter l'adhérence on coule d'abord sur les plaques de verre absolument propres une couche de gélose que l'on porte à 100°. On coule ensuite la gélose servant à la réaction.

On utilise avantageusement des plaques de verre photo de dimension 13 cm × 13 cm, lavées et soigneusement séchées.

L'électrophorèse :

L'électrophorèse s'effectue dans une cuve en matière plastique. Les plaques de verre sur lesquelles on a coulé la gélose sont en relation par des bandes de papier-filtre avec une solution tampon à courant lent qui assure la stabilité du pH, et avec des électrodes en platine. On établit une différence de potentiel de 3 à 4 V/cm, ce qui permet d'obtenir un transport suffisant des protéines en 4 heures. La réaction doit se faire à la température du laboratoire. Pour obtenir une migration assez rapide, il faut une différence de potentiel assez élevée, qui provoque une augmentation de température. Pour diminuer celle-ci, il suffit d'abaisser la concentration en électrolytes. Cependant, il se produit dans les bacs une électrolyse qui entraîne une modification du pH. C'est pour cette raison qu'on emploie un dispositif permettant un écoulement contraire de la solution tampon dans le bac.

Réaction de précipitation :

Les immunsérums doivent être fortement précipitants et contenir les anticorps correspondant à tous les constituants antigéniques du mélange. Lorsqu'on travaille avec des mélanges peu connus, il est utile d'hyper-immuniser les animaux donneurs de sérum et de faire des essais préliminaires pour contrôler l'activité des immunsérums.

La réaction de précipitation est plus complète en pH neutre. Pour réaliser cette neutralité après électrophorèse, on plonge les plaques recouvertes de gel dans un bain constitué par une solution tampon de phosphates de pH 7,0 à 7,4 et isotonique.

Lorsqu'on a coulé la gélose, et avant sa solidification, on dépose sur les plaques de verre une mince baguette de verre qui servira de gouttière parallèlement à l'axe de migration électrophorétique. On y dépose l'immunsérum ainsi dilué :

Sérum	0,2 cc
Eau distillée	0,3 cc
Gélose à 2 %	0,5 cc

Les antigènes seront disposés dans de petites gouttières creusées à l'emporte-pièce et perpendiculaires à celles contenant l'immunsérum. Pendant tout le temps de la réaction, il convient de conserver les plaques dans une pièce humide et à température à peu près constante.

Pour éviter le développement de la flore microbienne, il est avantageux d'ajouter à tous les produits de l'*éthyl-mercuri-thiosalicylate de sodium* en solution de 1/5000 à 1/10.000.

Lorsque la réaction est terminée (environ 3 à 4 heures) on détache les plaques de verre et on les dispose trois à quatre jours dans le soluté physiologique pour extraire les impuretés et conserver seulement les lignes de précipitation spécifique.

Pour enregistrer les résultats, GRABAR et WILLIAMS (29) préconisent *la photographie par superposition directe de la plaque porteuse du gel sur du papier photographique dur ou sur des films de fort contraste.*

L'immuno-électrophorèse a surtout été appliquée pour mettre en évidence le nombre de constituants antigéniques par rapport aux protéines du sérum humain ; d'autre part, en étudiant un immunsérum de cheval, on a pu observer jusqu'à 18 lignes de précipitation, *ce qui montre que le sérum contient au moins* 18 *protéines ayant des propriétés antigéniques spécifiques.*

L'immuno-électrophorèse est également utilisée pour contrôler la pureté d'une préparation ; on a pu déceler ainsi la *fraction antigénique contenant des impuretés.*

Cette méthode permet de déterminer la position des anticorps dans le sérum humain. Si l'on injecte du sérum humain à un animal, on obtient après l'immuno-électrophorèse de son sérum *des lignes de précipitation se situant en face des* γ-*globulines.*

Comme cette technique donne des réactions avec toutes les substances protidiques, on a par exemple pu montrer qu'un sérum antityphique donne une précipitation avec un *mannane* (polyoside) ce qui dénote la présence d'antigènes polyosidiques dans cet immunsérum.

Etant donné les réactions individuelles des animaux immunisés, il convient d'utiliser un mélange de plusieurs sérums et de doser préalablement les anticorps. Malgré cet inconvénient, l'immuno-électrophorèse présente des avantages certains : *spécificité absolue, emploi de quantités minimes de réactifs et appareillage relativement simple.* Cependant, au cours de nos recherches il nous a été impossible de mettre en évidence avec cette technique des lignes de précipitation spécifiques à l'aide des immunsérums de lapins préparés par nous. Nos nombreux essais ne nous ont pas permis de réaliser un équilibre réactionnel toxine-antitoxine approprié. Une hyperimmunisation ou une concentration par lyophilisation des précipitines ne cadraient pas avec le but de notre travail, nous avons dû avoir ainsi recours à d'autres techniques.

CHAPITRE IV

PRINCIPE DE LA METHODE DE FLOCULATION DE DEAN ET WEBB

Cette réaction consiste à ajouter à des quantités constantes d'immunsérum (anticorps) *à examiner des quantités progressivement décroissantes de l'antigène correspondant.* On note alors l'apparition d'un précipité en fonction du temps. Il s'agit donc d'une technique en phase liquide. La précipitation s'effectue à des moments différents pour chaque mélange et son apparition se produit en fonction du rapport des concentrations entre l'antigène et l'anticorps du mélange. La précipitation apparaît en premier lieu dans le mélange où la proportion antigène-anticorps est la meilleure et c'est dans celui-ci que l'antigène et l'anticorps précipitent quantitativement. Ayant déterminé le mélange optimal pour un système donné, on peut calculer la quantité d'anticorps contenue dans un sérum inconnu.

TECHNIQUE :

On prépare tout d'abord les dilutions de l'antigène et de l'immunsérum homologue. Pour cela, on ajoute à un volume donné de solution-mère un volume calculé de soluté physiologique permettant l'obtention de la dilution voulue. Celle-ci doit être faite avec tous les soins nécessaires pour obtenir un mélange homogène. En utilisant la même pipette, on procède aux dilutions successives en partant de la dilution la plus grande. On distribue un volume égal (0,5 cc) de chacune des dilutions dans une série de tubes de 8 cm × 1 cm. Puis on ajoute un volume d'immunsérum dilué égal au volume d'antigène distribué. L'introduction de l'antisérum doit se faire très rapidement et le mélange doit s'effectuer immédiatement en retournant deux ou trois fois le tube. On dispose alors les tubes au bain-marie à 37° en les immergeant au tiers de leur hauteur. On doit observer les tubes à intervalles réguliers pour noter celui où la précipitation se manifeste en premier, et qui révèle le mélange antigène-anticorps homologue optimal.

Ce premier dosage donne une indication approximative. On peut alors préparer une deuxième gamme de tubes *dans lesquels on répartit des volumes décroissants d'antigène à partir de la dilution ayant donné la première précipitation.* On complète à volume constant (0,5 cc) au moyen de soluté physiologique et on ajoute des volumes constants (0,5 cc) d'immunsérum dilué. On porte au bain-marie à 37° et on note à nouveau le tube où la précipitation apparaît en premier lieu.

Nous avons pratiqué des essais avec l'*anatoxine diphtérique* à 10 U/cc pure et le *sérum antidiphtérique* de 5.000 à 10.000 U, dilué au 1/50e. D'autre part, nous avons examiné l'*anatoxine staphylococcique pure et le sérum antistaphylococcique dilué au* 1/50e, essais qui nous ont montré que ces doses d'antigène et d'anticorps réalisent des conditions favorables à la précipitation.

Celle-ci se produit au bout de 12 et même de 24 heures. C'est pour cette raison que nous avons ajouté à notre système antigène-anticorps de la *Ninhydrine* à raison de 1 cc d'une solution de 0,1 % pour 1 cc de sérum. La précipitation passe alors de 24 heures à 4 heures environ. Les avantages de l'emploi de la Ninhydrine ont été démontrés par l'école de Neuzil (30). Il convient de laisser agir la Ninhydrine pendant 24 heures à 37° ; son action accélératrice sur les immunsérums de lapin est indépendante de l'antigène employé. Par contre, elle agit tout différemment sur un immunsérum de cheval, *où elle retarde la réaction de précipitation.* Cette différence d'action n'a pas encore été expliquée.

Pour chaque dosage, nous avons préparé une série de 12 tubes selon le tableau suivant :

TABLEAU N° 1

Réactif	Tubes n°											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anatoxine pure à 10 U/cc ...	0,50	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10		—	—	—
Anatoxine diluée au 1/10e	—	—	—	—	—	—	—	—	0,50	0,40	0,30	0,20
Soluté physiologique	—	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	—	0,10	0,20	0,30
Antisérum au 1/50e	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Unités	5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0,4	0,3	0,2

Par la suite nous avons effectué des expériences sur la *toxine staphylococcique* qui nous a été fournie, pour tous nos travaux, par le Docteur Richou. Nous avons utilisé des toxines préparées à partir de souches Wood : nos 2155, 2173, 2175, 2177, 2178 entre autres. Nous avons observé que le système optimal semblait réalisé par *la toxine employée pure et le sérum antistaphylococcique dilué à* 1/2.

En présence de *Ninhydrine* la précipitation apparaît au bout de 4 heures environ sous forme de petits flocons qui se déposent ensuite au fond du premier tube de précipitation, puis, assez rapidement, dans les autres tubes. On se rend ainsi compte de la nécessité d'observer souvent la gamme de tubes pendant la réaction.

La réaction classique de DEAN *et* WEBB ne constitue pas une méthode quantitative très précise et ses résultats doivent être confirmés par une méthode plus systématique et plus rigoureuse. Ces considérations nous ont amené à reprendre l'étude de toutes ces toxines par *la méthode biophotométrique à l'aide de l'appareil de Bonet-Maury.*

Avant d'exposer ces recherches nous voudrions donner quelques détails sur le *pouvoir hémolytique des toxines fournies par* RICHOU *et d'une toxine préparée par nous-même.*

ETUDE DU POUVOIR HEMOLYTIQUE DES TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES :

Nous avons préparé une toxine d'une *souche de Wood* ensemencée sur milieu gélosé et repiquée *sur milieu* R.A.P. et en atmosphère de CO^2. Après 7 jours de culture à 37°, nous avons filtré sur bougie Chamberland L 3.

Pour contrôler le pouvoir hémolytique, il nous fallait préparer des globules rouges de lapin ; nous avons prélevé le sang par ponction de la veine marginale de l'oreille, le sang a été recueilli sur une solution de citrate de soude à raison de 1,2 cc d'une solution à 10 % pour 10 cc de sang. On centrifuge, on décante et on lave à trois reprises les hématies au moyen de soluté physiologique. Après la troisième centrifugation, on ramène au volume initial et on dilue au 1/3 avec du soluté physiologique.

Mode opératoire :

Dans une série de six tubes à hémolyse on dispose la toxine et le sérum selon le schéma suivant :

TABLEAU N° 2

Toxine 1 cc	Tubes n°					
	1	2	3	4	5	6
	Dilutions d'immunsérums : q.s.p.					
Pure	2					
1/10		2				
1/100			2			
1/500				2		
1/1.000					2	
1/10.000						2
Hématies de lapin au 1/3	1 goutte	1 goutte	1 goutte	1 goutte	1 goutte	1 goutte

On dispose pendant 1 heure à l'étuve à 37° puis pendant 1 heure à la température du laboratoire. On peut procéder alors à la lecture pour déterminer la *dose minimale hémolytique*. Pour la toxine préparée par nous, nous avons constaté une hémolyse dans les deux premiers tubes, tandis que les toxines préparées par RICHOU ont en général donné une hémolyse dans les trois premiers tubes.

Pour déterminer la *dose combinée hémolytique*, on introduit dans une série de tubes une unité antitoxique de sérum standard dilué de façon à pouvoir employer un volume de 1 cc. On ajoute ensuite des quantités croissantes de toxine : 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 cc, etc., puis on complète à 2 cc au moyen de soluté physiologique. On mélange et on ajoute à tous les tubes une goutte de suspension d'hématies de lapin diluées au 1/3. On dispose pendant 1 heure à l'étuve à 37° et 1 heure à la température du laboratoire, puis on procède à la lecture *pour déterminer la neutralisation du pouvoir hémolytique par rapport à une unité antitoxine de sérum standard*.

En résumé, nous pouvons conclure que les méthodes hémolytiques fournissent, comme la méthode de DEAN et WEBB, des indications sur la richesse de la toxine en étude au point de vue pouvoir hémolytique et pouvoir antitoxique. Mais pour obtenir des résultats plus précis, nous avons jugé utile d'avoir recours à *la méthode biophotométrique*.

CHAPITRE V

LA BIOPHOTOMETRIE

Le Biophotomètre de Bonet-Maury est un appareil qui permet d'enregistrer graphiquement l'augmentation de l'opacité provoquée par la réaction de précipitation et de floculation d'antigènes-anticorps, en fonction du temps.

L'appareil de *Bonet-Maury* est entièrement automatique et il comprend :

UN PHOTOMETRE :

L'ensemble photométrique est placé dans une enceinte thermostatique contrôlée par un régulateur de température bimétallique à cadran et un voyant lumineux réglant la température jusqu'à 45°. Le faisceau lumineux correspondant à chaque cuve peut être diaphragmé. Chaque diaphragme est indépendant et commandé par un disque molleté. En cas de solution peu colorée, des filtres neutres peuvent être interposés entre la cuve et la cellule photoélectrique pour diminuer l'intensité du flux lumineux.

L'appareil comprend six cuves qui passent successivement et à intervalles réguliers toutes les six minutes devant la cellule photoélectrique ; celle-ci est reliée à un appareil enregistreur qui transcrit la courbe d'opacité sur un cylindre tournant à une vitesse constante. Le fabricant fournit une gamme de cuves d'épaisseur et de contenance variées ; chaque cuve est constituée par un cylindre de verre pyrex horizontal limité par deux faces optiquement planes et parallèles. A l'intérieur de chaque cuve on dépose une bille ou une barre métallique à enrobage spécial, animée magnétiquement d'un mouvement de va-et-vient à vitesse et intensité réglables.

UN ENREGISTREUR :

Un *galvanomètre* enregistre automatiquement et successivement toutes les 20 secondes six courbes par six faisceaux émis par la même lampe. La courbe correspondant à chaque faisceau traduit la variation d'opacité du liquide placé dans la cuve correspondante. Le galvanomètre à six courbes est encastré dans le panneau de commande de la boîte d'alimentation. La vitesse de déroulement du papier sur lequel s'inscrivent les courbes est constante et peut être réglée à deux vitesses différentes : 20 et 60 mm à l'heure.

L'ALIMENTATION ELECTRIQUE :

Elle est stabilisée sur un secteur alternatif de 80 périodes compensant les variations de tension de fréquence, amenant ainsi la stabilité absolue dans le temps. La boîte d'alimentation est reliée à l'enceinte thermostatée par un cable multiple, souple, sous gaine de protection platisque.

MODE D'EMPLOI :

On dispose le tableau d'enregistrement et l'enceinte thermostatique sur un support stable et horizontal. On place l'enceinte thermostatique à gauche du tableau d'enregistrement. Avant de relier l'appareil au secteur, on doit vérifier si les interrupteurs sont bien dans la position levée. Abaisser lentement le levier de verrouillage, ce qui a pour effet de libérer l'aiguille du système de mesure galvanométrique. On règle le zéro mécanique de l'appareil en déplaçant doucement le levier rouge situé au-dessous du cadran, soit vers la droite, soit vers la gauche.

Vérifier ensuite si la tension du secteur correspond à celle portée sur la plaque indicatrice située sur le socle, puis brancher sur le secteur. En abaissant l'interrupteur général, la lampe centrale doit s'allumer. La mise en marche du chauffage réglé s'effectue par abaissement d'un interrupteur, un voyant s'allume alors. Pour le réglage de la température, on dispose d'un système semblable à celui des bains-marie. La température se stabilise au bout de 10 minutes. D'après le fabricant, il peut arriver que la température indiquée sur le thermomètre et celle du liquide placé dans les cuves diffèrent de 2°. Cette différence est due au léger échauffement des bobines d'agitation magnétique. Pour la mise en marche de celle-ci, il suffit d'abaisser l'interrupteur correspondant. Le réglage de la vitesse de cette agitation se fait par un bouton spécial et celui de l'intensité par un autre bouton.

REGLAGE INITIAL DU DEPART DES COURBES :

Les cuves remplies de liquide à mesurer sont mises en place dans leur cave respective.

1° Lire dans la petite fenêtre située à gauche de la bande d'enregistrement le numéro de la cuve en service.

2° En manipulant doucement la molette commandant le diaphragme de la cuve correspondante, on amène l'aiguille du galvanomètre jusqu'à la division 100°.

3° Abaisser l'interrupteur et attendre 20 secondes : c'est le temps nécessaire à l'enregistrement de l'opacité et au déplacement de la cuve cédant la place à la cuve suivante dont le numéro apparaît à la fenêtre prévue à cet effet.

4° Relever l'interrupteur, procéder au même réglage de la mollette, de manière à amener l'aiguille du galvanomètre à 100°.

5° Procéder de même pour les autres cuves.

Lorsque toutes les cuves sont réglées, laisser l'interrupteur abaissé en permanence pendant le nombre d'heures nécessaire à la formation de la précipitation.

5° Pour arrêter l'appareil, relever successivement tous les interrupteurs, puis l'interrupteur général.

Remarque :

Pour le nettoyage des cuves, on peut utiliser le mélange sulfochromique, rincer à l'eau distillée, puis stériliser à l'autoclave.

Avant de placer les cuves dans l'enceinte thermostatique, il est bon de brancher l'appareil pendant une heure, pour obtenir une température stable. L'appareil peut alors, sans surveillance, enregistrer l'évolution de l'expérience pendant une durée de quelques heures à plusieurs jours.

EXPERIENCES PRELIMINAIRES :

Avant d'effectuer les réactions antigène-anticorps au moyen de l'appareil de *Bonet-Maury*, à l'aide de sérum de lapin immunisé, nous avons travaillé avec :

1° *Du sérum antistaphylococcique de l'Institut Pasteur ;*

2° *Du sérum antistaphylococcique lyophilisé à* 200 *U/cc de* Richou.

Expériences au moyen du sérum antistaphylococcique de l'Institut Pasteur :

Nous avons utilisé comme antigène les toxines 2153, 2155 et 2153, et comme anticorps *le sérum antistaphylococcique de l'Institut Pasteur.* Le mode opératoire ressort du schéma suivant :

TABLEAU N° 3

Réactifs cc	Tubes n°					
	1	2	3	4	5	6
Toxine pure	1,00	0,80	0,60	0,50	0,45	0,40
Sérum au 1/2 + Ninhydrine ...	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Soluté physiologique	3,50	3,70	3,90	4,00	4,05	4,10

Cette expérience ne nous a donné que des résultats négatifs, à l'exception de la toxine 2158, qui était la plus active, comme l'ont montré toutes les autres réactions (Dean et Webb et pouvoir hémolytique). En présence du *sérum antistaphylococcique IP*, cette toxine seule a présenté une certaine déviation de la courbe biophotométrique.

Nous avons repris cette expérience en employant le sérum antistaphylococcique aux dilutions de 1/5 et de 1/50 et n'avons obtenu aucune opacification.

On pourrait en conclure que l'*immunsérum de l'Institut Pasteur* n'était pas assez fort par rapport aux toxines et que, par suite, les concentrations en antigène et en anticorps n'étaient pas favorables à la réaction de précipitation.

Expériences avec le sérum antistaphylococcique lyophilisé :

Richou a bien voulu mettre à notre disposition des flacons contenant 1 g de poudre lyophilisée de sérum antistaphylococcique. Diluée avec 10 cc de soluté physiologique, cette poudre donne *un sérum antistaphylococcique à* 2.000 U/cc. Cette dilution a été utilisée *avec la toxine* 2158 dans une gamme d'expériences que nous décrivons dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 4

Réactifs	Tubes n°					
	1	2	3	4	5	6
Toxine pure	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,0
Sérum au 1/2 200 U/cc	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Soluté physiologique	3,5	3,7	3,9	4,0	4,1	4,5

A titre documentaire, nous reproduisons les courbes enregistrées au biophotomètre.

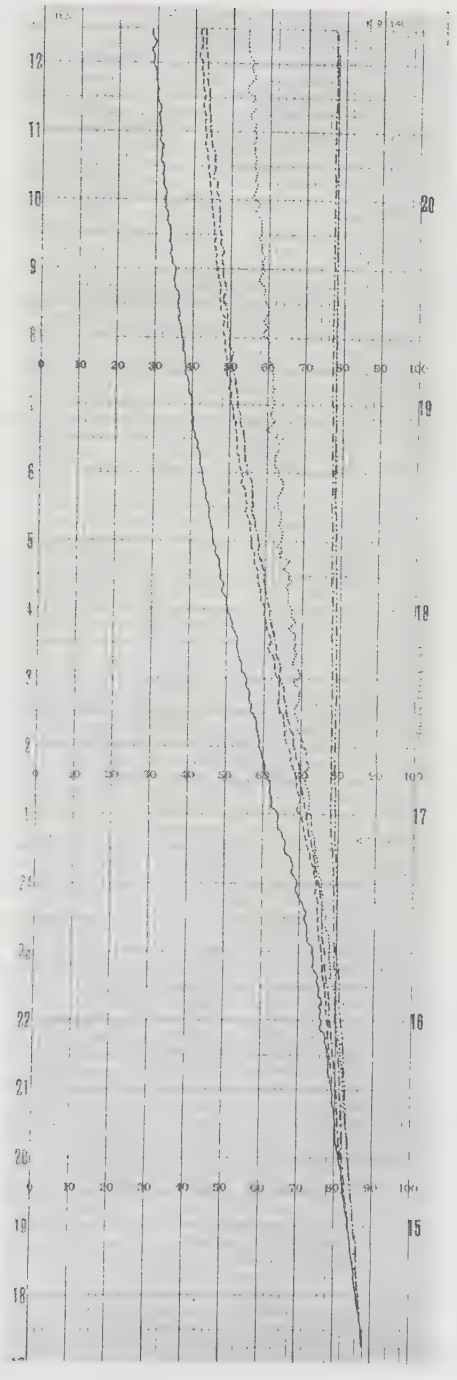


Fig. 1. — Réaction de Dean et Webb enregistrée au Biophotomètre au moyen d'immunsérum lyophilisé de Richou à 100 U et de la toxine 2158 aux doses de 0,4 à 1 cc.

En considérant ce graphique on se rend compte que *la réaction de précipitation antigène-anticorps* est très nette dans les quatre premières cuves avec un optimum dans la cuve 1. Les autres toxines mises en expérience ont donné des courbes moins nettes.

CHAPITRE VI

PREPARATION ET EXPERIMENTATION DE NOS TOXINES ET IMMUNSERUMS

Deux éléments sont essentiels dans la réaction de précipitation antigène-anticorps : la *toxine* servant d'antigène et le *sérum* contenant les précipitines.

PREPARATION DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE :

A ce sujet, il faut choisir une souche hautement toxigène ; nous avons retenue la souche 2158. D'autre part, il importe d'utiliser un milieu de culture optimal pour la toxigenèse. Dans notre historique, nous avons montré l'importance du milieu de culture pour l'obtention d'une bonne toxine. Nous y avons décrit divers milieux et avons finalement retenu le milieu R.A.P. de BOIVIN et RICHOU (31) composé d'après les essais de base de RAMON. AMOUREUX et POCHON.

PREPARATION DU MILIEU R.A.P. :

On fait chauffer 3 litres d'eau du robinet à 50° au bain-marie. A ce moment on ajoute 650 g de viande de cheval hachée, débarrassée du tissu conjonctif et de la graisse. Agiter souvent et porter à nouveau à la température de 50° (ce qui demande 10 minutes environ). On ajoute alors 5 g de *papaïne* soigneusement délayée dans un peu d'eau tiède ; on fait monter lentement la température jusqu'à 70°, ce qui doit prendre environ 25 minutes ; d'après RICHOU ce temps est très important. Arrêter le bain-marie pendant 10 minutes ; à ce moment la température intérieure du flacon atteint environ 75°. Retirer le bain-marie et filtrer à chaud sur papier Chardin. Le pH est de 6,8, on l'ajuste à 7,4 aussitôt après la filtration, ce qui demande environ 80 cc de *lessive de soude* à 80 g $^0/_{00}$ pour un volume total de 4,5 litres de bouillon ainsi préparé. On porte alors à l'autoclave à 110° pendant 15 minutes pour précipiter les phosphates et les autres substances de ballast. On filtre à chaud et on laisse refroidir jusqu'à la température du laboratoire. A ce moment le pH est d'environ 7,8 à 8,0.

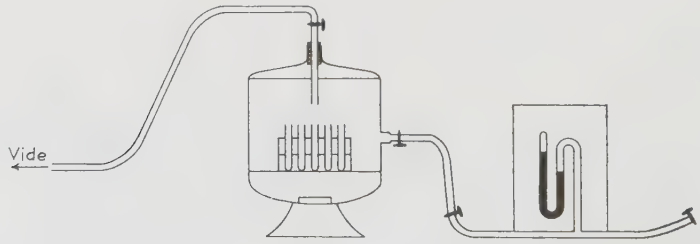
On doit le réajuster à 7,4 à l'aide d'acide chlorhydrique pur. Il faut environ 2,75 cc pour 3 litres de bouillon. On répartit ensuite en tubes que l'on stérilise pendant 45 minutes entre 112° et 115°. *Les cultures de Staphylocoques* doivent être pratiquées en atmosphère de 20 % d'anhydride carbonique.

La souche-mère doit être cultivée sur milieu gélosé et âgée de 4 à 6 semaines au moment du repiquage.

OBTENTION DE L'ATMOSPHERE D'ANHYDRIDE CARBONIQUE :

Le bouillon R.A.P étant préparé, on dispose les tubes dans un dessiccateur dans le fond duquel on a déposé une cupule contenant quelques grammes de bicarbonate de soude, puis on verse autour environ 20 cc d'acide sulfurique concentré. Le dessiccateur étant fermé, on le remue avec précaution pour faire entrer en contact les parcelles de bicarbonate de soude avec l'acide sulfurique. On obtient ainsi un dégagement de CO^2. Le dessicateur est relié par son robinet supérieur à une pompe à vide et par son robinet latéral à un manomètre. On réalise un vide de 20 % dans le dessiccateur. A ce moment, on agite le dessiccateur, la pression remonte dans le manomètre ; on laisse une petite marge pour éviter une surpression formée par le dégagement de CO^2. A ce moment, on ferme le robinet latéral et le robinet supérieur du dessiccateur et on le porte à l'étuve. La figure ci-dessous illustre ce dispositif :

(Figure n° 2)



La culture s'effectue à 27° pendant 7 jours, ce qui semble, d'après Richou et ses élèves, le temps le plus favorable à l'obtention d'une toxine riche en valeur antigénique.

Dès le deuxième jour on voit se former un anneau blanchâtre à la surface du milieu de culture. Au bout de 7 jours, on ouvre précautionneusement le dessicateur, on retire les tubes de culture et on filtre le milieu sur *bougie*

Chamberland L 3. A ce sujet, on a intérêt à préparer plusieurs fioles à vide sur lesquelles on a adapté les *bougies Chamberland*. Le tout est stérilisé à l'étuve à 130°. On relie les fioles à des trompes à vide, ce qui permet de filtrer plusieurs échantillons en même temps, d'où gain de temps, étant donné que la filtration sur *bougie Chamberland* est très lente.

On obtient un liquide jaune, limpide, contenant la toxine staphylococcique. Si le filtrat reste trouble dans une fiole, nous le refiltrons sur *filtre Iéna recouvert d'une légère couche de charbon stérile*, ce qui a cependant comme inconvénient de diminuer plus ou moins le pouvoir toxigène.

Nous avons ainsi préparé plusieurs échantillons de toxines que nous avons comparés à celles que Richou a bien voulu nous envoyer, toutes prêtes et préparées récemment. Après de nombreux essais qui ont montré que ces toxines n'étaient pas toutes de force égale, nous avons pensé à employer des mélanges à parties égales. C'est ainsi que nous avons fait des expériences à l'aide du *biophotomètre de Bonet-Maury* au moyen de toxines préparées à partir des souches 2158, 2173, 2175, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182. Ce mélange a été employé pour la vaccination de nos lapins et nous l'appelons « *polytoxine* ».

PREPARATION DE L'IMMUNSERUM :

Nous avons utilisé des lapins mâles, jeunes, de même souche, pesant de 3.000 à 4.000 g. Nous leur avons injecté 0,5 cc de *polytoxine* par voie sous-cutanée au niveau de l'abdomen, à raison de 2 injections à 4 jours d'intervalles. Nous avons alors constaté l'apparition d'une escarre au niveau de l'inoculation, avec formation d'une plaie pouvant atteindre 5 cm de diamètre. Un de nos animaux a considérablement maigri et n'a jamais repris son poids normal par la suite. La guérison de cette dermonécrose ne s'est produite totalement qu'au bout d'un mois, après application journalière de solution de mercurochrome à 1 % et de pommade à l'extrait placentaire. Pour éviter une infection généralisée, nous avons de plus fait ingérer à nos lapins, par voie buccale, de la *Tifomycine en poudre chocolatée* deux fois par jour. A la suite de ces traitements et de l'amélioration de l'état général de nos lapins, nous avons procédé, trois semaines après la dernière injection, à une nouvelle piqûre de toxine, pratiquée par voie intramusculaire cette fois, au niveau de la cuisse, pour éviter les accidents dermiques. La dose injectée était de 1 cc, renouvelée 5 jours plus tard. Huit jours après cette dernière injection, nous avons effectué les premiers prélèvements de sang.

Mentionnons tout de suite que nous avons travaillé avec deux séries de lapins, dont les uns étaient vaccinés avec la polytoxine seule, alors que les autres recevaient simultanément des injections de 0,2 cc d'acide pantothénique.

PRELEVEMENT DE SANG :

Ces prélèvements ont été pratiqués par ponction de la veine marginale de l'oreille. Nous avons rasé l'oreille au niveau de la ponction et badigeonné l'endroit à l'aide d'un tampon de coton imbibé de xylol, ce qui a pour effet de provoquer la turgescence de la veine, d'après la technique de SARTORY et MEYER (32). A l'aide d'une seringue stérile munie d'une aiguille de 30/10, on recueille dans un tube à centrifugation stérile environ 5 cc de sang de lapin. Le sang est laissé au repos pendant une à deux heures, afin de rendre plus facile la rétraction du caillot. Après le prélèvement, on lave soigneusement l'oreille avec de l'eau distillée, car le xylol provoque des desquamations de la peau qui empêcheraient des ponctions ultérieures.

Puis on centrifuge le sang pendant 10 minutes à 2.000 tours/minute. On décante soigneusement le sérum et on centrifuge à nouveau jusqu'à ce que le sang soit absolument dépourvu de globules rouges. Pour procéder à la réaction de précipitation, il faut inactiver le sérum pendant 30 minutes à 56°, puis on ajoute la Ninhydrine et on laisse en contact pendant 20 minutes.

REACTIONS DE PRECIPITATION ANTIGENE-ANTICORPS :

Comme nous l'avons exposé antérieurement, nous avons utilisé au cours de nos expériences différentes dilutions de la toxine et de l'immunsérum, et ceci aussi bien pour les *réactions de* DEAN *et* WEBB que pour celles à l'aide du *biophotomètre Bonet-Maury*. En effet, il est essentiel d'opérer avec des dilutions optimales qui permettront les meilleures conditions des réactions. C'est pour cette raison que nous avons employé la réaction de DEAN et WEBB, *qui permet de déterminer utilement les zones correspondantes de dilutions entre la toxine et le sérum*. Par la suite, nous avons tenté d'utiliser ces deux réactifs aux dilutions les plus faibles possibles.

La *polytoxine* a été utilisée à 1/100, 1/50, 1/20, et 1/10, mais il s'est avéré qu'il faut l'employer à l'*état pur* si la quantité introduite dans la réaction est très petite. Pendant toutes nos expériences la polytoxine a toujours été utilisée pure dans les réactions au biophotomètre. Par contre, nous avons dû modifier la méthode de DURRER (33) ; cet auteur affirme que le système optimal est atteint avec une dilution de 1/50^{e} d'immunsérum en présence d'une toxine pure ou diluée au 1/10^{e}. En effet, nos essais avec des dilutions d'immunsérum à 1/10, 1/5 et 1/2 nous ont donné les meilleurs résultats.

Pour enregistrer numériquement les résultats nous avons eu recours dans ces essais préliminaires à l'*électrophotomètre Lumetron* qui mesure le degré d'opacité. Les réactions étaient effectuées d'après le tableau n° 4, page 26 et nous donnons dans le tableau suivant les différentes valeurs enregistrées par rapport aux dilutions d'immunsérum employées : 1/50, 1/5, 1/2.

TABLEAU N° 5

Contrôle après	Degrés Lumetron — Toxine en cc					
	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,0
		Immunsérum 1/50				
1 heure	3	5	5	3	4	4
2 heures	6	7	7	5	6	6
3 heures	8	8	8	7	6	6
4 heures	12	8	10	8	8	8
5 heures	16	12	10	8	8	8
6 heures	24	15	11	9	8	8
		Immunsérum 1/5				
1 heure	5	5	5	5	5	5
2 heures	7	7	7	7	7	7
3 heures	8	8	8	8	8	8
4 heures	10	9	9	8	9	8
5 heures	10	10	10	9	10	9
6 heures	11	10	10	10	10	10
		Immunsérum 1/2				
1 heure	8	11	12	4	4	4
2 heures	11	15	18	7	7	7
3 heures	16	16	24	8	8	8
4 heures	22	24	30	8	8	8
5 heures	30	28	38	8	8	8
6 heures	40	38	44	8	8	8

Interprétation :

D'après ce tableau nous constatons que la diminution d'intensité lumineuse est négligeable dans les premières heures pour les dilutions d'immunsérum de 1/50 et de 1/5. Elle est assez faible ensuite jusqu'à la sixième heure. Par contre, avec l'immunsérum dilué à 1/2, l'opacification est sensible dès la première heure pour les trois premières cuves et augmente progressivement avec le temps. Avec les concentrations en toxines de 0,5 et 0,4 cc la réaction de précipitation reste négative. Ce fait montre que la dilution d'immunsérum à 1/2 *est celle qui réalise le rapport optimal avec la toxine pure et à la dose de* 0,8 *et* 0,6 *cc.* Cette dernière dose semble être la plus favorable par rapport à la concentration en immunsérum.

CONTROLE DE L'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR LA FORMATION DE PRECIPITINES :

Il s'agit d'expériences effectuées au moyen de la méthode de DEAN et WEBB. Comme nous l'avons déjà dit, nous avons travaillé avec deux séries d'animaux, l'une traitée par la *polytoxine* et *l'anatoxine de l'Institut Pasteur*, l'autre recevant en plus 0,2 cc de *pantothénate de calcium*, injecté tous les jours par voie intramusculaire. Le protocole expérimental ressort du tableau suivant que nous donnons à titre d'exemple.

TABLEAU N° 6

Date	Série I		Série II		
	Polytoxine	Toxine IP	Polytoxine	Toxine IP	Bépanthène
12.2	0,5		0,5		0,2
13.2					0,2
14.2					0,2
15.2					0,2
16.2	0,5		0,5		0,2
17.2					0,2
18.2					0,2
19.2					0,2
20.2					0,2
21.2					0,2
1.3					0,2
2.3		1,0		1,0	0,2
					0,2
7.3		1,0		1,0	0,2
8.3					0,2
16.3	Prélèvement				
17.3					0,2
3.5	Prélèvement				
11.5					0,2
	Prélèvement 6 heures après cette injection				

Nous donnons ci-dessous les résultats de ces expériences, enregistrés par le *biophotomètre de Bonet-Maury*.

TABLEAU N° 7

Prélèvements six semaines après la première injection

Contrôle après	Degrés biophotométriques — Toxine en cc					
	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,0
			Série I — Lapin 1			
2 heures	18	14	14	15	12	6
4 heures	42	32	36	34	30	9
6 heures	54	44	50	51	43	10
8 heures	58	50	58	58	46	10
10 heures	64	52	60	60	50	
12 heures	68	54	64	64	52	11
	TOTAL : 1.423 — Moyenne : 47.4					
			Série I — Lapin 2			
2 heures	25	16	12	6	5	5
4 heures	48	34	28	9	7	7
6 heures	61	50	44	10	7	7
8 heures	64	56	52	12	8	8
10 heures	68	58	56	12	8	8
12 heures	74	65	60	14	8	8
	TOTAL : 1.018 — Moyenne : 33,9					
			Série II — Lapin 3			
2 heures	7	10	7	8	6	4
4 heures	21	18	16	16	12	6
6 heures	43	36	36	38	28	7
8 heures	52	47	46	50	37	8
10 heures	56	52	50	54	40	9
12 heures	58	55	54	58	43	10
	TOTAL : 1.098 — Moyenne 36,6					
			Série II — Lapin 4			
2 heures	14	16	14	14	10	2
4 heures	44	37	35	30	26	4
6 heures	55	54	47	45	43	6
	TOTAL : 584 — Moyenne 39,0					
	Expérience arrêtée après la 6e heure					

Interprétation :

En considérant ce tableau on se rend compte qu'en général les proportions d'antigène et d'anticorps mises en œuvre sont bien équilibrées et répondent aux conditions optimales de la réaction de Dean et Webb. En effet, le démarrage de la précipitation est très rapide ou même immédiat pour nos mélanges antigène-anticorps constitués par la polytoxine pure et de l'immunsérum de lapin dilué à 1/2. Les courbes ont été enregistrées 9 jours après la dernière injection de toxine staphylococcique et, comme on le voit, le mélange optimal pour la réaction de précipitation est de 1 cc de toxine pour 0,5 cc de sérum dilué à 1/2. En effet, les valeurs les plus importantes et apparaissant le plus rapidement, s'inscrivent toujours dans la première cuve. A ce sujet, nous nous permettons d'attirer l'attention sur *la rigueur de la méthode biophotométrique par rapport à l'interprétation macroscopique*, pour laquelle nous avions enregistré les meilleurs résultats dans la 3e cuve, où la dose de toxine était plus faible.

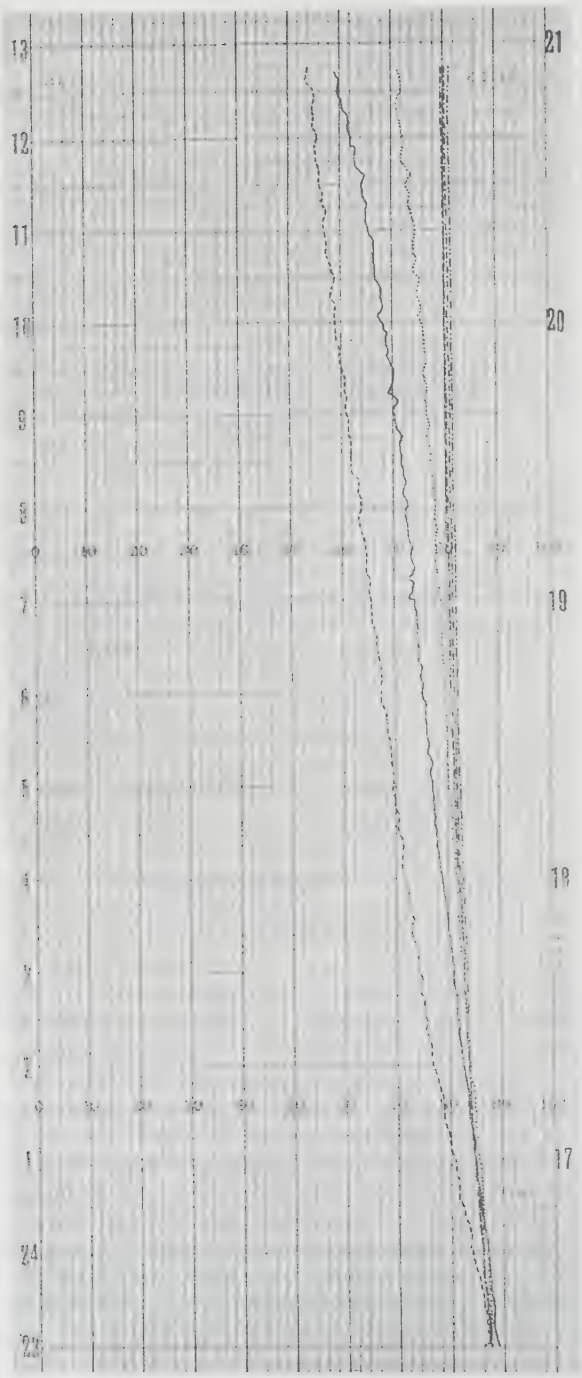


Fig. 3. — Réaction de Dean et Webb enregistrée au Biophotomètre au moyen d'un immunsérum prélevé 9 jours après la dernière vaccination du lapin n° 1.

Exemple illustrant l'importance du rapport entre les doses décroissantes de toxine et de l'immunsérum fixe (0,5 cc) dilué à 1/2.

En considérant *les courbes enregistrées par le biophotomètre*, on se rend compte *de la vitesse de démarrage* de la réaction de précipitation, en rapport avec les doses optimales d'antigène et d'anticorps. D'autre part, on note un *point culminant* dans la courbe, que nous considérons comme

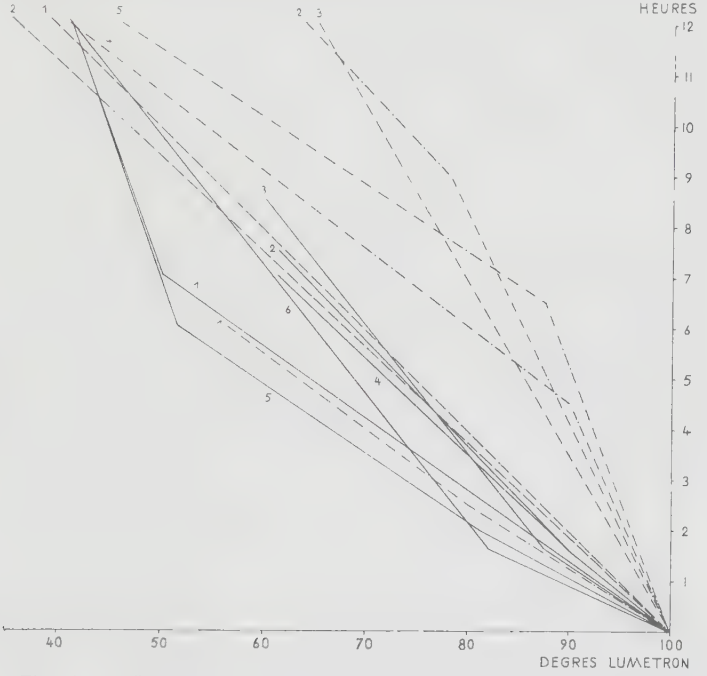


Fig. 4. — Courbes montrant les points maximums de déviation de la réaction de précipitation en rapport avec la durée de l'immunisation.
Immunsérums des 4 lapins prélevés à 6 semaines d'intervalle environ.

maximum de déviation en rapport avec la durée de la réaction. Nous constatons que la réaction de précipitation devient moins spécifique au-delà de ce point culminant, de sorte que l'on ne devrait prendre en considération que les valeurs obtenues dans les huit premières heures.

Dans le cas du lapin n° 1, on constate que les cinq courbes correspondant aux 5 mélanges antigène-anticorps se suivent de très près. Le démarrage de précipitation est presque immédiat et le maximum de déviation se situe entre la 4e et la 6e heure.

Dans le cas du lapin n° 2, seuls les trois premiers mélanges donnent des réactions de précipitation nettes, et encore c'est dans la première cuve que la réaction est la plus manifeste. Pour ces 3 cuves, le démarrage est également immédiat et le maximum de déviation se situe entre 4 et 6 heures. Ce cas démontre également l'importance de l'équilibre antigène-précipitine, puisque la réaction de Dean et Webb est sensiblement négative dans les cuves 4 et 5.

Le lapin n° 3, soumis à un traitement combiné de *toxines et de pantothénate*, possède des doses de précipitines amenant une évolution des courbes

sensiblement analogue à celle du lapin n° 1, mais plus faible cependant. La réaction de précipitation est positive dans les cinq cuves mais le démarrage est beaucoup plus lent, se manifestant seulement après 4 heures et le degré d'opacification est en général inférieur à celui du lapin n° 1.

Ce fait ressort également de la courbe biophotométrique, puisque le maximum se manifeste seulement entre la 6e et la 8e heure.

Cette différence est moins prononcée entre le lapin n° 1 et le lapin n° 4, où le démarrage de la précipitation est de nouveau plus rapide, se manifestant dès les premières heures et le maximum est obtenu vers la 6e heure. Nous avons dû arrêter cette expérience à ce moment, puisque la cuve témoin a subi une déviation anormale qui ne permettait plus de s'y référer.

De l'ensemble de ces résultats il semble ressortir *que l'acide pantothénique n'a aucune action favorisante sur la genèse des précipitines.*

C'est pourquoi nous avons poursuivi nos expériences pour étudier l'effet de la vitamine B 5 sur *la stabilité des précipitines.* Nous avons entrepris ces recherches pour la raison suivante : Etant donné que nous avons dû interrompre l'expérience sur le lapin n° 4 après la 6e heure, nous avons procédé, quatre jours plus tard, à une nouvelle prise de sang pour effectuer la réaction de Dean et Webb au biophotomètre à titre comparatif avec l'expérience précédente. Nous rapportons dans le tableau suivant les résultats obtenus.

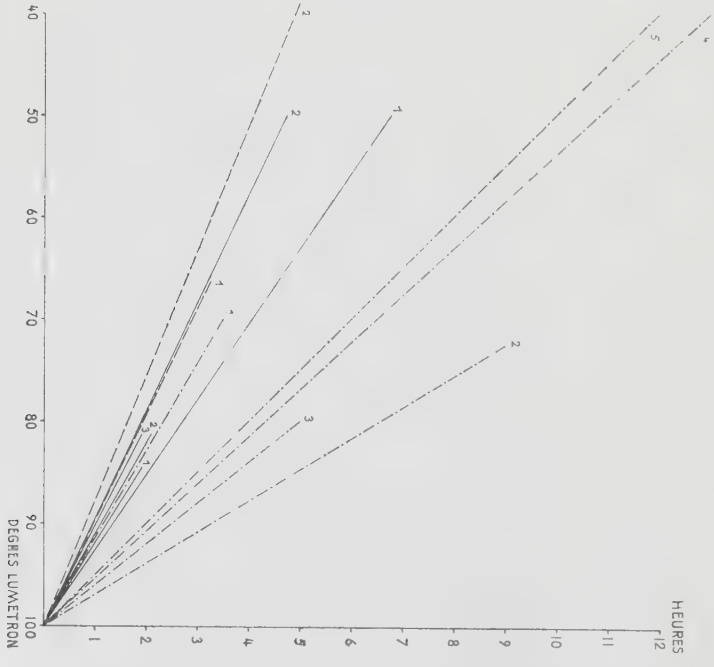


Fig. 5. — Courbes montrant la déviation maximale de la réaction de précipitation en rapport avec la durée de l'immunisation.

TABLEAU N° 8

Contrôle après	Degrés biophotométrique					
	Toxines cc					
	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,0
2 heures	15	15	15	16	15	4
4 heures	28	28	28	31	26	6
6 heures	41	40	40	34	30	8
8 heures	48	44	45	40	40	8
10 heures	54	46	51	44	41	8
12 heures	54	52	48	48	45	13

En comparant ces résultats avec ceux du premier prélèvement chez ce lapin, on note un démarrage de la précipitation sensiblement identique. L'optimum de la réaction se manifeste également dans la première cuve et est nettement diminué pour les cuves 4 et 5, *démontrant un abaissement du taux des précipitines*, plus manifeste ici que dans le premier prélèvement. Ce fait devient apparent également dans les cuves 1, 2 et 3 où l'opacité a nettement baissé à la 6e heure, par rapport au premier prélèvement. Le taux total de précipitation est nettement inférieur à celui des lapins 1 et 2. Nous croyons pouvoir en conclure par conséquent qu'ici aussi l'acide pantothénique n'a pas d'action stimulante sur la production des précipitines et que, d'autre part, *la pantothénothérapie ne semble pas exercer une action stabilisante du taux de précipitines « in vivo »*, puisque le prélèvement effectué 4 jours après le premier, fait ressortir une légère diminution de ce taux. On voit par conséquent l'intérêt de la suite de nos expériences.

DEUXIEME SERIE D'EXPERIENCES :

Cette série d'essais est constituée par le dosage des précipitines dans le sang des mêmes lapins deux mois après la dernière injection de toxine. Il nous importait de déterminer le maintien du pouvoir précipitant en fonction du temps ; il s'agira donc de comparer les résultats de cette expérience avec ceux de l'essai précédent. Nous spécifions que la pantothénothérapie a été pratiquée quotidiennement tout au long de ces essais.

TABLEAU N° 9

Contrôle après	Degrés biophotométriques — Toxines cc					
	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0'0
	Série I — Lapin 1					
2 heures	4	5	5	5	5	2
4 heures	14	10	12	10	10	2
6 heures	24	20	24	22	10	2
8 heures	30	26	32	30	24	3
10 heures	36	27	38	31	23	4
12 heures	44	39	42	28	22	5
	TOTAL : 678 — Moyenne : 22,6					
	Série I — Lapin 2					
2 heures	20	20	6	6	6	5
4 heures	39	34	8	8	8	7
6 heures	48	40	10	10	10	8
8 heures	58	52	10	10	10	8
10 heures	60	58	10	10	10	8
12 heures	65	60	10	10	10	8
	TOTAL : 760 — Moyenne : 25,3					
	Série II — Lapin 3					
2 heures	17	14	12	13	11	7
4 heures	28	26	26	17	21	10
6 heures	34	34	34	36	28	11
8 heures	36	36	37	38	30	12
10 heures	40	38	39	40	32	13
12 heures	44	40	42	44	36	15
	TOTAL : 981 — Moyenne : 32,7					
	Série II — Lapin 4					
2 heures	14	10	8	8	6	4
4 heures	30	22	21	20	12	6
6 heures	34	26	30	30	14	6
8 heures	38	32	38	34	20	8
10 heures	40	34	40	36	24	8
12 heures	42	36	40	38	28	10
	TOTAL : 847 — Moyenne : 28,3					

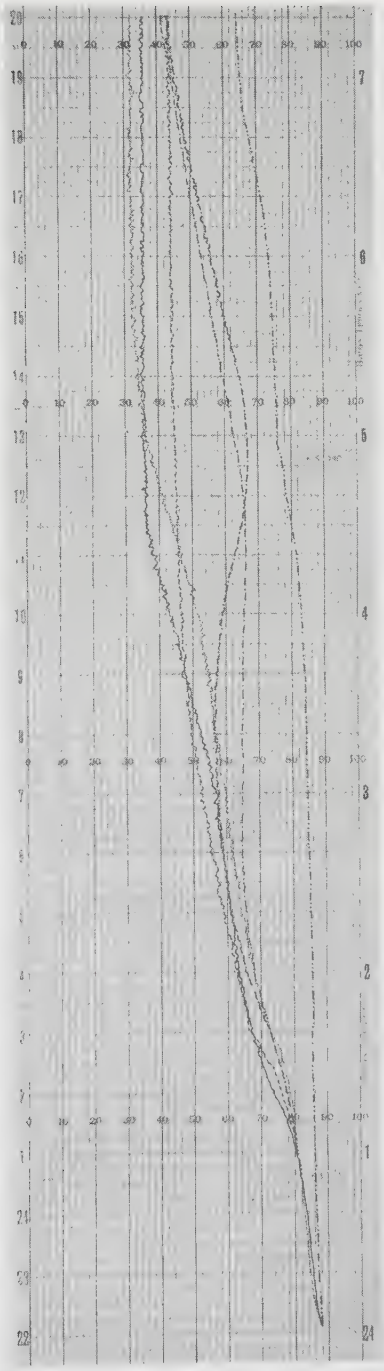


Fig. 6. — Courbes biophotométriques obtenues au moyen de l'immunsérum du lapin n° 3 prélevé avant l'injection de Bépanthene.

Les 5 cuves contiennent la toxine à doses décroissantes de 1 cc à 0.4 cc.

----	1	cc	de	toxine	----
.....	0,8	cc	de	toxine	.....
— — —	0,6	cc	de	toxine	— — —
. .	0,5	cc	de	toxine	. .
. _ .	0.4	cc	de	toxine	. _ .

Interprétation :

En considérant les résultats et en comparant les valeurs de la réaction de DEAN et WEBB entre elles, *on note tout d'abord que les lapins traités par l'acide pantothénique élaborent le plus de précipitines.*

Pour le lapin n° 2, le taux de précipitines a tellement diminué au cours des deux mois suivant la dernière injection de toxine que la réaction ne reste positive qu'uniquement dans les deux premières cuves (1 cc et 0,8 cc de toxine). Pour les autres animaux, le taux de précipitines tout en ayant bien diminué, semble encore suffisant pour maintenir l'équilibre antigène-anticorps. Pour le lapin n° 1 la réaction de précipitation semble tardive, puisque les courbes dévient seulement après la 4e heure. Ce fait est moins marqué pour les trois autres animaux.

En comparant les résultats de la première expérience (six semaines après la première injection) avec ceux de la seconde expérience (deux mois après la dernière injection) il faut retenir que pour le lapin n° 1 les courbes sont en général moins accentuées dans cette dernière. La valeur totale des cinq réactions est de 1.423 dans le premier essai et de 673 dans le second. En considérant seulement la première cuve, où la réaction de précipitation est la plus marquée, nous obtenons après 12 heures une opacification de 63° lors du premier contrôle et de 44° lors du deuxième. D'autre part, le démarrage de la précipitation est beaucoup plus lent et on ne note pas de maximum manifeste dans l'évolution de la courbe de l'essai n° 2. Il en est de même pour les autres cuves, dont les courbes suivent de près celle de la première cuve.

Pour le lapin n° 2 qui avait déjà mal répondu à la vaccination lors du premier contrôle, donnant au total une valeur de 1.018, ce fait devient encore beaucoup plus probant lors du second prélèvement, avec une valeur se chiffrant seulement à 760. Il faut noter cependant que le démarrage de la réaction de DEAN et WEBB dans les deux premières cuves est rapide.

En résumé nous pouvons dire *que pour cette première série d'animaux le taux de précipitine a déjà nettement baissé deux mois après la dernière injection de toxine.*

En ce qui concerne les lapins nos 3 et 4, ayant bénéficié de la pantothénothérapie quotidienne, on note également une diminution des précipitines, se chiffrant pour le premier à une valeur totale de 931 et de 847 pour le deuxième ; cependant, en comparant les deux expériences, on voit que le démarrage de la précipitation est beaucoup plus marqué dans le sérum prélevé tardivement et le point culminant de la courbe se situe entre la 4e et la 6e heure de contrôle. Pour ces deux animaux également, la réaction est la plus intense dans la première cuve (1 cc de toxine).

Une remarque s'impose au sujet du lapin n° 1 : Nous avons constaté dans la seconde expérience un phénomène de redissolution du précipité dans les cuves 4 et 5, et ceci après la 8e heure. Ce fait montre bien l'importance du choix d'un bon rapport entre les proportions de toxine et d'immunsérum mis en œuvre.

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que *l'immunité baisse assez rapidement chez les lapins vaccinés normalement*, puisqu'on peut constater de telles différences de précipitation à un intervalle de 40 jours environs. *Cette diminution est nettement freinée par la pantothénothérapie, qui semble agir soit comme un adjuvant, soit comme un réactif protecteur vis-à-vis des précipitines*, du complément ou des γ-globulines.

Il nous a donc semblé intéressant de contrôler, dans une troisième série de prélèvements, l'influence de *l'acide pantothénique sur l'immunité* par le contrôle du taux de précipitines au moyen du biophotomètre de Bonet-Maury.

TROISIEME SERIE D'EXPERIENCES :

Nous avons modifié la technique en injectant 0,2 de *Bépanthène* à chacun des lapins de la série II, puis nous avons effectué les prélèvements six heures plus tard. Pour déterminer l'action du Bépanthène, il suffit alors de comparer les courbes de précipitation obtenues avec celles de l'expérience précédente.

TABLEAU N° 10

Contrôle après	Degrés biophotométriques — Toxine cc					
	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,0
	Lapin n° 3					
2 heures	6	6	4	6	4	4
4 heures	18	13	10	12	9	6
6 heures	28	24	22	23	16	8
8 heures	37	34	30	33	24	10
10 heures	44	38	38	42	32	10
12 heures	50	44	44	48	38	12
	TOTAL : 827 — Moyenne : 27,6					
	Lapin n° 4					
2 heures	17	14	14	13	13	5
4 heures	38	34	26	28	20	6
6 heures	63	53	51	52	44	8
8 heures	66	60	60	60	51	8
10 heures	68	64	64	64	56	8
12 heures	70	66	66	68	60	14
	TOTAL : 1.473 — Moyenne : 49,1					

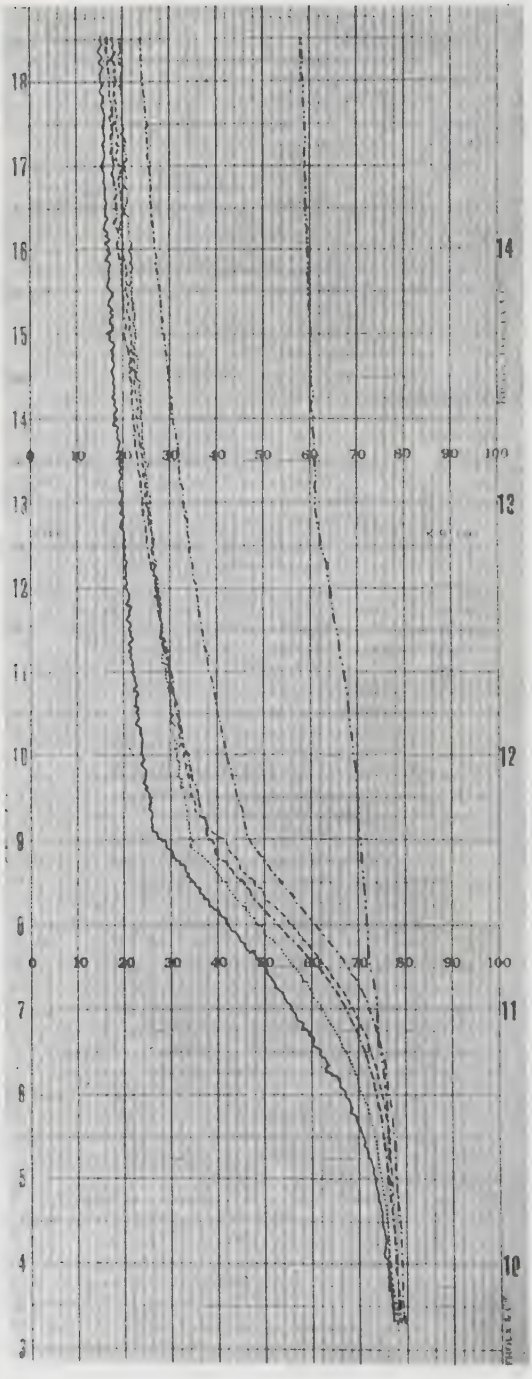


Fig. 7. — Courbes biophotométriques obtenues au moyen de l'immunsérum du lapin n° 3 prélevé 6 heures apres l'injection de Bépanthène, montrant l'augmentation du taux des précipitines dans les 5 cuves contenant la toxine aux doses de 1 cc à 0,1 cc.

Interprétation :

En comparant les deux courbes du lapin n° 3, l'une représentant le pouvoir précipitant avant l'injection du Bépanthène et l'autre après cette injection, *on constate tout d'abord que le démarrage de la précipitation est beaucoup plus lent dans la deuxième courbe*, mais après la sixième heure on note une *augmentation progressive* plus prononcée qu'avant l'injection du Bépanthène, de sorte que l'opacité devient plus forte à partir de la 8e heure dans le sérum traité au Bépanthène. Ce fait se manifeste dans l'ensemble des courbes. Le point culminant de la précipitation devient ainsi plus marqué pour le dernier prélèvement.

Ces constatations sont encore plus manifestes chez le lapin n° 4. *Ici, le démarrage de la précipitation est plus précoce avec le sérum vitaminé ;* la réaction de Dean et Webb évolue d'une façon beaucoup plus spectaculaire dans l'ensemble des cuves et par rapport au temps, de sorte que nous totalisons finalement pour le sérum du lapin non vitaminé 847° et pour celui du lapin traité au Bépanthène 1.473°. On note ici la forte teneur en précipitines de l'immunsérum : la précipitation dans la 5e cuve ne contenant que 0,4 cc de toxine est plus forte que dans l'expérience témoin (sans Bépanthène) avec un mélange de l'immunsérum et de 1 cc de toxine.

Nous avons donné à titre d'exemple ces tableaux et ces graphiques concernant les résultats obtenus avec des immunsérums formés par quatre lapins.

En réalité nous avons travaillé avec huit lapins dont quatre étaient soumis à la vaccination normale et les quatre autres à la thérapie combinée de vaccin et de Bépanthène.

Les valeurs de la réaction biophotométrique obtenues avec les immunsérums de ces quatre animaux se sont chiffrées de la façon suivante :

TABLEAU N° 11

	Lapins N°			
	5	6	7	8
	Vaccination normale		Vaccination combinée à la vitamine B 5	
	Valeurs biophotométriques			
Total	866	748	1389	1512
Moyenne	28,8	24,9	46,3	54,0

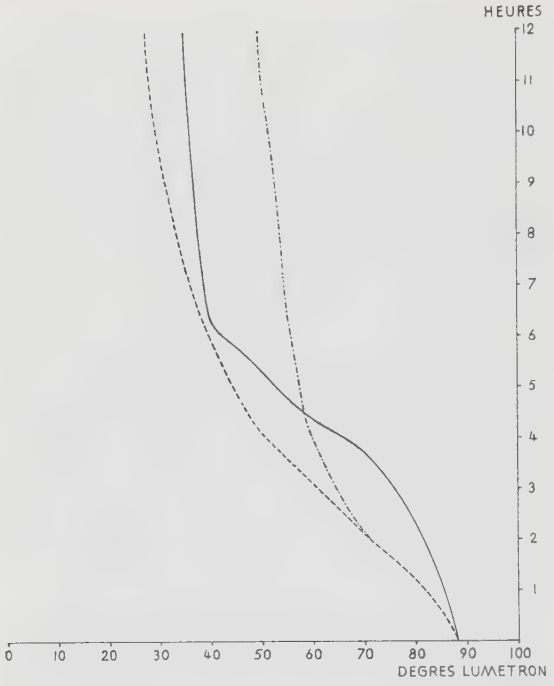


Fig. 8. — Courbes illustrant l'action du Bépanthène sur la vitesse et l'optimum de la réaction de précipitation et l'influence de la durée de l'immunisation sur le taux des précipitines.
Immunsérum prélevé sur le lapin nº 3 :

———— 9 jours après la dernière vaccination.

—·—·— 6 semaines plus tard avant l'injection de Bépanthène.

— — — 6 semaines plus tard, mais 6 heures après l'injection de Bépanthène.

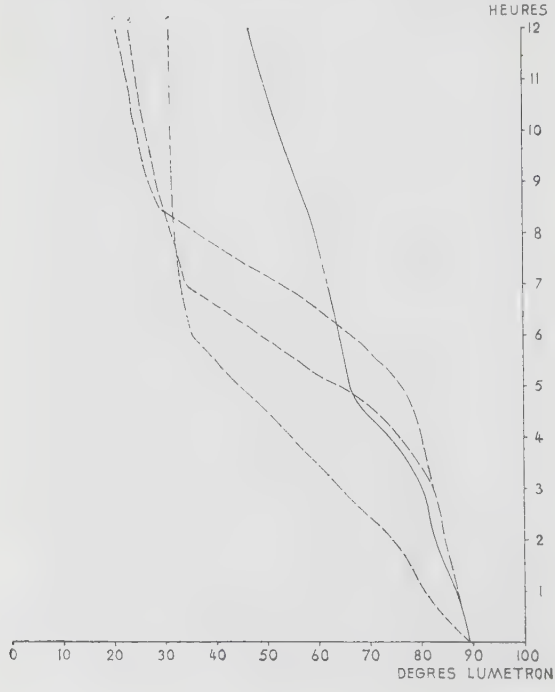


Fig. 9. — Courbes biophotométriques illustrant l'action du Bépanthène sur le taux des précipitines.

———— Courbe avant l'injection du Bépanthène.

— — — courbes nºs 1, 2 et 3 : 3 prélèvements successifs chacun 6 heures après une nouvelle injection de Bépanthène.

Ces valeurs confirment donc parfaitement celles que nous avons obtenues à l'aide des immunsérums des lapins n^{os} 1 à 4 dont nous avons donné les résultats en détail.

Dans ce troisième essai, les maximums de la courbe sont atteints, dans l'ensemble, après 6 heures.

Après ces comparaisons, l'action de l'acide pantothénique sur les précipitines se manifeste d'une façon spectaculaire *et nous permet de conclure à sa grande influence sur les précipitines dans les sérums immunisés de lapin, dans les premières heures suivant l'injection de la vitamine* qui agit alors dans le sens d'un phénomène d'activation de l'immunité.

CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail avait principalement pour but de mettre au point *une technique quantitative de précipitation*, sensible à différents antigènes staphylococciques. Pour cette raison nous donnons dans notre partie historique un bref aperçu général des différentes méthodes de floculation et de précipitation ayant trait à ce problème du rapport antigène-précipitines.

D'autres chercheurs ont essayé d'élucider la question de la nécessité d'un équilibre du système antigène-anticorps, en s'adressant à des méthodes telles que la *déviation du complément* et l'*aggutination*. Etant donné la notion de dualité des anticorps, apparaissant à la suite de l'intervention d'un même antigène, il nous a semblé intéressant d'approfondir ce problème, en mettant en œuvre des systèmes antigène-anticorps déjà éprouvés, tels que les *anatoxines staphylococciques* et des *immunsérums antistaphylococciques de l'Institut Pasteur ;* puis nous avons étudié *des antigènes et des toxines staphylococciques préparés* par les grands spécialistes français en cette matière, *de l'école de* RAMON. Les anticorps employés provenaient soit de l'*Institut Pasteur*, soit de l'*Office International des Epizooties* ou encore d'autres Etablissements fabriquant des sérums et vaccins. Finalement, nous avons eu recours à des toxines et immunsérums préparés par nous-mêmes.

Notre choix s'est fixé sur l'emploi *des réactions de précipitation*, puisque dans son travail concernant l'*influence de l'acide pantothénique sur l'immunité antistaphylococcique*, VIGUIÉ a relevé l'importance du mode d'immunisation pour réaliser ces deux critères : nécessité d'un certain équilibre entre les doses d'antigène et d'anticorps dans chaque système réactionnel, puis *de doses relativement faibles à injecter pour l'étude de l'influence de l'acide pantothénique* ou de tout autre facteur stimulant immunologique.

En injectant des doses très fortes d'antigène, l'installation d'une *hyperimmunisation peut masquer l'influence de l'acide pantothénique*. VIGUIÉ a ensuite remarqué que dans les conditions les plus favorables, l'immunité n'apparaît à son taux maximal qu'à partir du 30e jour après la dernière injection et, compte tenu de ce que les antigènes staphylococciques ne sont pas doués d'un pouvoir immunisant marqué, il semble, d'après cet auteur, que la réaction de précipitation soit la méthode de choix pour mesurer quantitativement le taux des anticorps. C'est donc pour ces raisons que nous avons repris ces travaux en ayant recours à cette méthode.

Nous avons divisé notre ouvrage en deux parties. Dans la *partie histoque*, nous avons réservé un chapitre à *la préparation des toxines staphylococciques* ; nous décrivons les milieux les plus favorables à la genèse des toxines. Cette dernière est spécialement envisagée dans le *Chapitre deuxième* où nous avons étudié les relations de la toxine staphylococcique avec la gravité des infections, le pouvoir hémolytique, cytolytique, et le pouvoir dermonécrotique des Staphylocoques.

Nous énumérons ensuite les différentes méthodes pour le titrage des *toxines staphylococciques et des anatoxines.*

Nos travaux personnels font l'objet de la deuxième partie de notre exposé. Nous avons retenu comme méthode apte à la mise en évidence de la réaction antigène-anticorps *l'immuno-électrophorèse* dont nous donnons une description succincte.

La méthode de précipitation de Dean *et* Webb a particulièrement retenu notre attention, car nous avons eu essentiellement recours à elle, tant en technique classique, c'est-à-dire à lecture macroscopique, qu'en l'adaptant à la *mesure biophotométrique par l'appareil de Bonet-Maury*, qui nous fournissait une indication quantitative rigoureuse. C'est pour cette raison que nous avons réservé *le chapitre V à la biophotométrie.* Nous donnons une description détaillée de la construction et de la manipulation du biophotomètre.

La mise au point de cette méthode biophotométrique a été réalisée tout d'abord avec des réactifs immunologiques connus : *l'anatoxine staphylococcique et le sérum antistaphylococcique de l'Institut Pasteur* comme antigène et anticorps.

Après la mise au point de cette technique, nous avons jugé nécessaire de réaliser des expériences préliminaires au moyen de la méthode classique de Dean et Webb en utilisant cette fois des toxines qui nous ont été gracieusement offertes par M. Richou. Ces antigènes ont été éprouvés vis-à-vis du *sérum antistaphylococcique de l'Institut Pasteur et d'un immunsérum lyophilisé concentré* de Richou. A la dilution de 1/10 cette préparation titre 2.000 U/cc ; nous l'avons utilisée en premier lieu avec une toxine qui s'était révélée très active. Les courbes ainsi enregistrées au biophotomètre illustrent la rigueur de notre technique.

Par la suite, nous avons eu recours à des mélanges de toxines et d'immunsérums que nous avons préparés nous-mêmes. Nous donnons les techniques de préparation de cette toxine, obtenue dans le milieu R.A.P. de Boivin et Richou dont nous donnons la préparation en détail. ainsi que les conditions de culture en atmosphère à 20 % d'anhydride carbonique.

Les immunsérums proviennent de lapins de même race et origine, que nous avons vaccinés à l'aide d'un mélange de toxines que nous avons appelé « *polytoxine* ».

Nous donnons à titre d'exemple un protocole expérimental dans un tableau, d'où ressort le mode de vaccination par l'emploi successif de poly-

toxine et de toxine IP. Au cours de ces travaux, nous avons pu nous rendre compte de l'importance de l'équilibre du système antigène-anticorps dans la réaction de Dean et Webb. En effet, nos premières expériences nous ont révélé que l'emploi de dilutions d'immunsérum de 1/50 et de 1/5 et de toxine préparée par nous ne se prêtait pas à l'expérimentation biophotométrique. C'est pour cette raison que, par la suite, nous avons employé l'immunsérum dilué à 1/2 ou à l'état pur et la polytoxine. Dans ces conditions nous avons obtenu des résultats suffisamment nets, comme le prouvent les graphiques qui illustrent ces premières expériences. On voit que la dilution d'immunsérum à 1/2 réalise le rapport optimal avec la polytoxine pure employée à la dose de 0,3 ou 0,6 cc pour 0,5 cc d'immunsérum dilué. Pour accélérer le phénomène de précipitation, nous avons eu recours à l'emploi de la Ninhydrine qui réduit la durée de l'expérience aux environs de 4 heures comme Neuzil l'a constaté pour la première fois.

Antérieurement à nos travaux, Ponnelle et Viguié avaient déjà constaté *l'effet favorable de la pantothénothérapie sur les anticorps naturellement préformés.* Le premier a dosé les *agglutinines* et le second les *précipitines.* Ponnelle avait étudié l'influence de l'acide pantothénique sur l'évolution de l'immunité au cours de la vaccination T.A.B., alors que Viguié s'est intéressé à l'action de la vitamine B 5 sur la production de l'antitoxine staphylococcique chez *les lapins dépourvus d'immunité antistaphylococcique naturelle.* A la suite de la publication des travaux de Ponnelle, Richou a contrôlé ses résultats par la méthode d'agglutination et est arrivé aux conclusions suivantes :

« *Les injections de pantothénate se montrent incapables, dans les conditions de nos essais, d'agir sur le développement et la stabilisation des antitoxines.* »

Etant donné cette controverse, nous avons donc repris ces travaux en ayant recours à la méthode de Dean et Webb et en employant comme réactif des toxines et l'anatoxine. Lors de nos expériences, *la pantothénothérapie* a été appliquée quotidiennement à raison de 0,2 cc en injection intramusculaire. Notre mode d'immunisation consistait à injecter à intervalle de 4 jours 0,5 cc de *polytoxine ;* puis 15 jours après la seconde injection, nous avons revacciné deux fois au moyen de 1 cc d'*anatoxine de l'Institut Pasteur* à 5 jours d'intervalle. Les prélèvements de sang ont été effectués 8 jours après la dernière injection.

Les résultats de *la réaction de précipitation de ces immunsérums* sont rapportés dans un tableau et un graphique qui démontrent la vitesse du démarrage de la précipitation en rapport avec les doses optimales d'antigène et d'anticorps, puis l'existence d'un point culminant dans les courbes de précipitation spécifiques, indiquant le maximum de déviation en rapport avec la durée de la réaction. En considérant les résultats de cette expérience, il paraîtrait que *l'acide pantothénique* n'a pas d'action favorisante sur la genèse des précipitines et leur taux au cours des six premières heures de l'expérience.

Nous avons poursuivi nos essais pour étudier l'effet de la vitamine B 5 *sur la stabilité de ces anticorps ;* nous les avons dosés dans le sang de nos

lapins deux mois après la dernière injection de toxine, tout en pratiquant quotidiennement la pantothénothérapie. De nos résultats antérieurs il ressortait que l'immunité baisse assez rapidement chez les lapins vaccinés normalement. Il faudrait donc procéder à une revaccination pour faire apparaître des précipitines après deux mois d'interruption de la vaccination. Chez les lapins soumis à *la pantothénothérapie*, par contre, *et ayant reçu une injection de vitamine 6 heures avant le prélèvement de sang*, l'action de l'acide pantothénique sur les précipitines se manifeste d'une façon très nette et les courbes obtenues nous permettent de conclure à un effet stimulant marqué de l'acide pantothénique sur ces anticorps dans les sérums immunisés de lapins.

Nous avons essayé d'expliquer ce phénomène *soit par une sorte d'action adjuvante sur l'immunité, soit par les faits constatés par* DURRER *qui remarque que dans l'organisme immunisé l'injection d'acide pantothénique n'intervient pas « de facto » dans la genèse des anticorps, mais a un effet favorable sur le taux de complément qui est ainsi stabilisé au cours de formation des anticorps.* La pantothénothérapie semble ainsi se justifier pour favoriser le processus d'immunisation spontanée ou artificielle, soit comme un réactif protecteur vis-à-vis des précipitines, du complément ou des γ-globulines, soit comme un « filtre physiologique » qui retient les toxines de la nécrose cellulaire et les produits d'agressivité de l'auto-défense organique anti-infectieuse.

BIBLIOGRAPHIE

(2) Acacio de Abreu. — Portugal Médical, 1960, 44, 474.

(24) Bigger, Boland et O'Meara. — Journ. of Path. and Bact., 1927, 30, 271.

(31) Boivin et Richou R. — C. R. Soc. Biol., 1936, 139, 547.

(11) Burnet. — Journ. Path. and Bact. 1929, 32, 717 ; 1930, 33, 1 ; 1931, 34, 741 et 759.

(17) Casman E. P. — Journ. of Bact., 1937, 34, 35.

(4) Courvoisier et Leau. — *Antibiotics and Chemotherapy*, 1961, VI, n° 6, p. 411.

(26) Douglas et Mac Clean. — Journ. Path. and Bact., 1937, 44, 47.

(6) Dumas. — Annales Institut Pasteur, 1914, 28, 213.

(33) Durrer P. — *Influence de l'acide pantothénique sur le complément et les anticorps spécifiques. A propos de la vaccination diphtérique, tétanique et T.A.B.* Thèse Docteur Pharm., Strasbourg, 1959.

(29) Grabar et Williams. — Biochem. and Biophys. Acta, 1955, 17, 67.

(10) Gross H. — Zeitschr. Infekt. 1929, 109, 479 ; Centralblatt f. Bakt., 1931, 123, 212.

(19) Knight. — *Bacteria Nutrition* (Med. Res. Council Spec. Reprt.), n° 20, 1 volume, London ; Biochem. Journ. 1937, 21, 731 et 966.

(27) Kourilsky E., Mercier P. et Pillet J. — Ann. Biol. Clin. 1949, nos 5-6, 173.

(13) Léonard G. et Holm A. — Journ. of Immunol., 1935, 29, 209.

(3) Muckter, Keller, Krupe et Sous. — Arzneimittelforschung, 1956, 6, 585.

(12) Nelis P. — Ann. Institut Pasteur 1934, 52, 597 ; C. R. Soc. Biol., 1935, 113, 7.

(14) Nelis P. — C. R. Soc. Biol., 1936, 121, 724.

(30) Neuzil, Marquevieille et Tayeau. — C. R. Ac. Sc., 1950, 23°, 489.

(7) Nicolle et Cesari. — Ann. Institut Pasteur, 1914, 28, 219.

(23) Oppenheimer. — Zbl. Bakt. Orig., 1911, 188.

(9) Parker J. — Journ. of exp. Med., 1924, II, 761.

(1) Ponnelle J. — *Influence de l'acide pantothénique sur l'évolution immunologique au cours de la vaccination T.A.B.*, Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1956.

(16) Ramon G. — C. R. Soc. Biol., 1936, 121, 375.

(18) Ramon G., Berthelot A. et Amoureux G. — C. R. Ac. Sc., 1936, 202, 515.

(20) Ramon G., Boivin et Richou R. — C. R. Ac. Sc., 1938, 207, 466.

(21) Ramon G., Mercier, Pochon et Amoureux. — C. R. Soc. Biol., 25 avril 1942.

(28) Ramon G., Richou R. et Mercier. — 1er Congrès des Microbiologistes de langue française, Paris, octobre 1938.

(5) Richou R. — C. R. Ac. Sc., 1956, 243, 111.

(32) Sartory A, Sartory R. et Meyer J. — *Microbiologie Pratique*, Maloine, Paris, 1950.

(15) Schwartz. — Thèse Méd. Paris, 1938.

(25) Seiffert. — Zbl Bakt. 1935, 135, 100

(8) Walbum. — Biochem. Zeit., 1922, 369 ; Acta Path. Scand., 1930, suppl. 3, 477.

(22) Walbum. — Zeit. Immunit., 1909, 70, 204.

Vu, Strasbourg, le 1er juin 1962.

Le Président du Jury,
R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 5 juin 1962

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
G. GAZET DU CHATELIER

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 7 juin 1962

Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
J.-F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION VII

PLAN DE TRAVAIL IX

PREMIERE PARTIE. — HISTORIQUE

CHAPITRE I

LES TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES 1

Milieux liquides 2

Milieu semi-synthétique 3

Milieu synthétique 3

Milieux solides 3

Influence du gaz carbonique et de diverses substances introduites dans le milieu de culture 4

CHAPITRE II

LA TOXIGENESE STAPHYLOCOCCIQUE 7

Relation entre la gravité des affections staphylococciques et le pouvoir toxigène 7

Relation entre le pouvoir toxigène et le pouvoir hémolytique .. 7

Propriétés de la toxine staphylococcique 8

Action des agents physiques et chimiques sur la toxine staphylococcique 11

Action des antibiotiques 12

Titrage des propriétés toxiques de la toxine staphylococcique.. 12

Propriétés antigènes 13

Relation entre les diverses propriétés de la toxine staphylococcique 14

CHAPITRE III

CHOIX D'UNE METHODE APTE A LA MISE EN EVIDENCE DE LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS 15

Principes de la réaction immuno-électrophorétique 16

Description de la méthode 16